



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

YARA TEIXEIRA VIDAL

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL
- VEGF (-2549 18PB D/I) EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

**CEILÂNDIA, DF
2015**

YARA TEIXEIRA VIDAL

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL
- VEGF (-2549 18PB D/I) EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
a obtenção do grau de Farmacêutico, na
Universidade de Brasília, Faculdade de
Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daiani Cristina Cilião Alves Haddad

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

CEILÂNDIA, DF

2015

YARA TEIXEIRA VIDAL

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL
- VEGF (-2549 18PB D/I) EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Daiani Cristina Cilião Alves Haddad
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/Universidade de Brasília)

Co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Haddad
(FCE/Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente e primordialmente, por me conceder forças diante de todas as dificuldades e desesperos, e me mostrar capacidade para enfrentá-los de forma digna. À Ele, e a Sua Mãe, a Virgem Santíssima, toda honra e toda glória por todas as conquistas que irei alcançar em vida.

À minha mãe, Maria Wanderly (Wanda), e ao meu pai, José Galdino, por toda a dedicação e amor que sempre me ofertaram. Obrigada por sempre me impulsionarem diante dos meus planos, mostrando-me o valor que uma educação nobre tem sobre o caráter de profissional e pessoal de qualquer ser humano.

À minha irmã, Giovanna, pelo carinho.

Às minhas avós, Raimunda e Rosa, por todas as preocupações, amparos e, principalmente, por todas as orações realizadas em pró da minha saúde e sucesso. A fé de vocês foi essencial nesse período de conclusão de curso.

Aos meus padrinhos, tias, em especial à Terezinha e à Vilani, tios, primos, e tantos outros familiares queridos que em todo momento transmitiram confiança e motivação através de sinceras e palavras e atitudes.

À todos os meus amigos que eu conquistei nesse período de graduação, principalmente à Ylka, e àqueles que permanecem comigo desde a infância, obrigada por todo o auxílio e companheirismo que pudemos compartilhar nesses últimos anos, em especial, nesses últimos meses.

Ao Laércio, que foi meu verdadeiro parceiro tanto nas situações alegres quanto nos momentos difíceis que vivemos nesses três anos no meio acadêmico e fora dele. Meu agradecimento a você será eterno.

Aos meus professores orientadores, Daiani e Rodrigo Haddad, pela assistência, paciência e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Obrigada.

Aos colegas técnicos e estagiários do LAC-FCe pela prontidão, colaboração e consideração que tiveram comigo durante os períodos que estivemos

juntos.

Aos professores da banca, Eduardo Antonio e Izabel Silva, pela compreensão e pela atenção em relação à avaliação deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Aneurisma intracerebral é uma condição anormal dos vasos intracranianos, ocasionado pelo enfraquecimento de suas paredes, ficando estas propícias à ruptura e hemorragia. Essas condições hemorrágicas conhecidas como Acidentes Vasculares Encefálicos Hemorrágicos (AVEH) posicionam-se entre as doenças que mais acometem vítimas, levando ao óbito ou à incapacidade neurológica grave. Os fatores de risco para o AVEH são multifatoriais, dentre eles, elementos ambientais e de base genética. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma glicoproteína fundamental no papel regulatório no desenvolvimento vascular fisiológico. Polimorfismos no gene do VEGF são relacionados com os níveis de expressão desse fator, dentre eles o polimorfismo na região promotora -2549 (18pb D/I).

Metodologia: A detecção dos polimorfismos do gene VEGF (-2549 18pb D/I) foi realizada pela técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em amostras de pacientes apresentando aneurisma intracerebral (n = 33), acometidos por AVEH (n = 70) e ainda indivíduos saudáveis (n = 33).

Resultados: O estudo revelou maior frequência do alelo VEGF -2549 18pbD Em pacientes acometidos com AVEH e do genótipo VEGF -2549 18pbDD nos pacientes acometidos com aneurisma intracerebral e também no grupo de pacientes total (aneurisma + AVEH) quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. Já com relação a avaliações de déficit neurológico e dependência funcional (Escala de Coma de Glasgow, Escala de Rankin, NIHSS e Índice de Barthel), foram observadas distribuições aleatórias das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo nos diferentes níveis das respectivas escalas.

Conclusão: O presente estudo apresentou o alelo VEGF -2549 18pbD como fator de risco para AVEH e o genótipo VEGF -2549 18pbDD como fator de risco para aneurisma.

Palavras chaves: VEGF -2549 DEL/INS 18pb, polimorfismo, acidente vascular encefálico, aneurisma.

ABSTRACT

Introduction: Intracerebral Aneurysm is an abnormal condition of the intracranial vessels, caused by the weakening of its walls, getting those prone to rupture and hemorrhage. These conditions, known as haemorrhagic Stroke Brain Hemorrhagic (AVEH), position between the diseases that most affect victims, leading to death or severe neurological inability. The risk factors to the AVEH are multifactorial, including environmental elements and genetic basis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a glycoprotein that possesses regulatory role in vascular development. VEGF gene polymorphisms are associated with expression levels of this factor, among them the polymorphism in the promoter region-2549 (18pb D/I).

Methodology: The detection of the polymorphism of the gene VEGF (-2549 18pb D/I) was performed by PCR technique (*Polymerase Chain Reaction*) in samples of patients with intracerebral aneurysm (n = 33), affected by AVEH (n = 70) and also healthy individuals (n = 33).

Results: The study showed higher frequency of allele VEGF -2549 18pbD in patients with AVEH and VEGF genotype -2549 18pbDD in patients with intracerebral aneurysm and, therefore, in patients total (aneurysm + AVEH) compared to the Group of healthy individuals. Regarding to evaluations of neurological deficit and functional dependency (Glasgow Coma scale, scale of Rankin, *NIHSS* and Barthel Index), were observed random distribution of allele frequencies and genotypic polymorphism at different levels of their scales.

Conclusion: The present study showed that VEGF-2549 18pbD allele is risk factors for AVEH and VEGF-2549 18pbDD genotype is risk factors for aneurysm.

Keywords: VEGF-2549 DEL/INS 18pb, polymorphism, stroke, aneurysm.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

ATP – Adenosina trifosfato

AVE – Acidente Vascular Encefálico

AVEH – Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico

D - Deleção

dL – Decilitro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECG – Escala de Coma de Glasgow

ERm – Escala Modificada de Rankin

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HSA – Hemorragia Subaracnóidea

I - Inserção

kb – Quilobases

mg – Miligrama

mM – Milimolar

NIHSS – *National Institutes of Health Stroke*

ng – Nanograma

pb – Par de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGF – Fator de Crescimento Placentário

pM – Picomolar

PTK – Proteínas tirosina quinases

Taq – *Thermus aquatius DNA polimerase*

TK – Tirosina quinase

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VEGFR – Receptores do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VPF – Fator de Permeabilidade Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aneurisma intracerebral.....	1
Figura 2 – Tipos de aneurisma quanto à forma geométrica.....	3
Figura 3 – Principais fatores de risco estabelecidos para AVE.....	5
Figura 4 - Gene VEGF com destaque da sua região promotora na qual localiza-se o polimorfismo alvo da análise (-2549 18pb D/I).....	9
Figura 4 – Visualização das amplificações do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) em gel de poliacrilamida corado com gel red.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala de Rankin modificada (ERm).....	14
Tabela 2 – Interpretação das pontuações na escala NIHSS.....	15
Tabela 3 – Iniciadores para detecção do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I).....	16
Tabela 4 – Protocolo da reação de PCR.....	16
Tabela 5 – Condições de amplificação do VEGF (-2549 18pb D/I)	16
Tabela 6 – Características clínicas e demográficas dos pacientes e indivíduos saudáveis.....	20
Tabela 7 – Características clínicas de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral ou AVEH e acometidos com AVEH.....	22
Tabela 8 – Frequências alélicas e genótípicas, e valores de p do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.....	24
Tabela 9 – Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) entre os diferentes níveis de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral.....	26
Tabela 10 – Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) entre os diferentes níveis de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com AVEH.....	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa/SES-DF.....	43
Anexo 2 – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.....	44
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de todos participantes da pesquisa.....	46
Anexo 4 – Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.....	52
Anexo 5 – ECG – Escala de Coma de Glasgow (ECG).....	55
Anexo 6 – Índice de Barthel.....	56
Anexo 7 – Gráficos das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis e com relação a avaliações de déficit neurológico e dependência funcional (escalas de Rankin e NIHSS e índice de Barthel).....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aneurisma Intracerebral e Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico	1
1.2. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	5
1.3. Polimorfismo do VEGF	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos:	11
4. METODOLOGIA.....	12
4.1 Indivíduos estudados	12
4.2 Classificação dos pacientes	12
4.3 Polimorfismo do VEGF -2549 18pb D/I)	15
4.4 Análise estatística	17
5. RESULTADOS	19
5.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes e indivíduos saudáveis	19
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	33
8. REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 1 - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa/SES-DF	43
ANEXO 2 – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.	44
ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de todos participantes da pesquisa.....	46
ANEXO 4 – Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.	52
ANEXO 5 – Escala de coma de Glasgow.....	55
ANEXO 6 – Índice de Barthel	56
ANEXO 7 – Gráficos das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo VEGF - 2549 18pb D/I entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis e com relação a avaliações de déficit neurológico e dependência funcional (escalas de Rankin e NIHSS e índice de Barthel).	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aneurisma Intracerebral e Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico

Aneurisma intracerebral é uma condição anormal dos vasos intracranianos, no qual se caracteriza por uma dilatação focal incomum em uma porção da parede arterial, devido a um enfraquecimento demasiado dessa região, ficando estes propícios à ruptura. Essa anormalidade pode ser de origem congênita, traumática (golpes ou ferimentos penetrantes na cabeça), infecciosa (a parede arterial apresenta-se debilitada por diferentes tipos de infecções), arterioesclerótica (enfraquecimento da artéria devido à placa aterosclerótica avançada), por alongamento séptico ou formação de bolsa para fora das paredes do vaso (HOLANDA et al., 1995; BLACK; MATASSARIN-JACOBS, 1996; JAJA et al., 2013) (Figura 1).

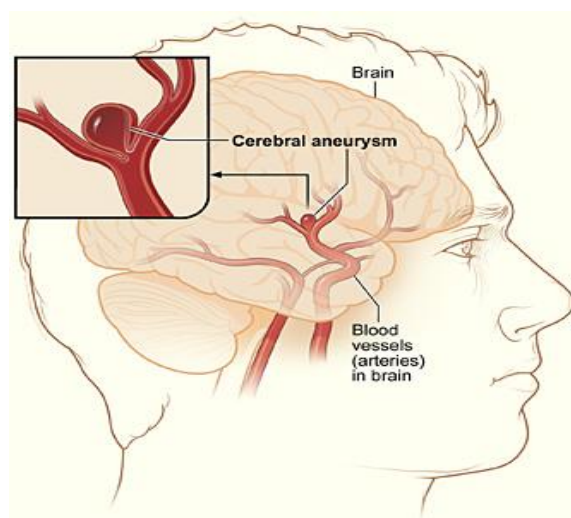


Figura 1: Aneurisma intracerebral

Fonte: <http://www.ineuro.com.br/para-os-pacientes/aneurisma-cerebral/>

A formação e o crescimento de aneurismas intracerebrais decorrentes de fatores congênitos são consequentes de anomalias (hipoplasias ou agenesias) dos vasos do polígono de Willis, um polígono anastomótico de onde saem as principais artérias para vascularização cerebral (NETTER, 2000); de defeitos na camada média arterial nas bifurcações de vasos, já que são nesses pontos onde há um maior estresse hemodinâmico; e relacionados a doenças hereditárias como, a doença policística renal (PCKD), coartação da aorta, displasia fibromuscular (MELO-SOUZA, 2008).

Estima-se que a prevalência de aneurismas intracerebrais na população mundial adulta chegue a 5%, com uma taxa de ruptura de aproximadamente 0,7% a 1,4% por ano (CARDOZO et al., 2011). As chances de ruptura aumentam com a idade, com incidência na sexta década de vida (TURCATO et al., 2006).

A etiologia dos aneurismas intracerebrais ainda não é totalmente esclarecida, contudo, entende-se por um processo multifatorial que resulta da alteração das condições hemodinâmicas (relação entre o fluxo sanguíneo e as variações morfológicas das artérias cerebrais e casos de hipertensão arterial) e da parede do vaso que leva a uma perda de proteínas estruturais e resistência da parede, com subsequente dilatação (HUMPHREY; TAYLOR, 2008).

Evidências comprovam que o componente genético é um forte influente na patogênese dos aneurismas intracerebrais, já que indivíduos que apresentam histórico familiar dessa doença têm um risco de 2,5% maior comparado o da população geral (CARDOZO et al., 2011). Outros estudos apontam que o sexo feminino apresenta uma maior prevalência (55%-65%) de desenvolvimento de aneurismas do que o sexo masculino (JUVELA, 2002). Fatores ambientais e comportamentais como, por exemplo: tabagismo, etilismo, uso de medicamentos a longo prazo, arteriosclerose e hipertensão arterial também podem ser responsáveis pelo desencadeamento de aneurismas (MELO-SOUZA, 2008).

Os aneurismas podem ser classificados em três grupos de acordo com seu tamanho: a) pequenos, com diâmetro inferior a 10 mm, b) grandes, com diâmetro de 10-25 mm e c) gigantes, com diâmetro superior a 25mm (BONNEVILLE; SOUROUT; BIONDI, 2006). A maior parte dos aneurismas intracerebrais (90%) é assintomática e tem um tamanho pequeno, apresentando um menor risco de ruptura (THE UNIVERSITY OF CHICAGO MEDICAL CENTER, 2015). Em casos mais raros, aneurismas cerebrais maiores podem, quando ainda não rompidos, comprimir alguma estrutura do cérebro e causar alguma paralisia, mais comumente do olhar, (fechamento e abertura das pálpebras), ou do tipo tontura ou fala enrolada, inclusive dores de cabeça intermitentes, fortes e rápidas, que surgem quando praticado algum tipo de esforço físico (MIRANDA, 2015).

Quanto à forma geométrica, os aneurismas podem ser: a) saculares, o tipo mais comum, onde apresenta dilatação das três camadas da parede, surgindo o

formato de um pequeno saco, muito comum nas bifurcações das artérias; b) fusiformes, onde também há a dilatação das três camadas da parede, porém o formato da artéria fica alongado, semelhante a um losango; e c) dissecantes, onde há a formação de uma espécie de canal paralelo pelo qual ocorre a circulação sanguínea, devido ao afastamento da túnica íntima (camada interna da parede arterial) em relação à camada média (SAYAMA, MACDONALD, 2010) (Figura 2).

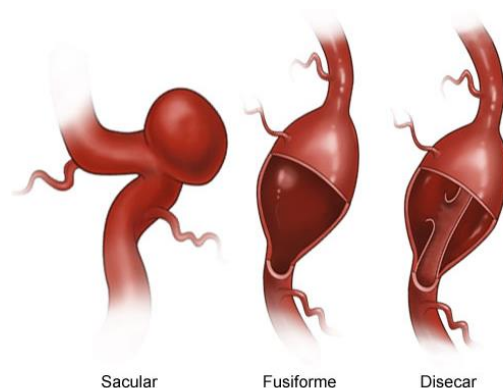


Figura 2: Tipos de aneurisma quanto à forma geométrica.

Fonte: <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=S08278>

A maioria dos aneurismas cerebrais só se torna sintomático quando se rompe, caracterizando-se como um aneurisma roto. Esse rompimento pode ocorrer espontaneamente, ou em situações de aumento súbito de pressão, geralmente em momentos de elevado esforço físico (REDE BRASIL AVC, 2010).

A ruptura desses aneurismas pode levar a uma hemorragia, em que muitas vezes o sangue fica limitado ao espaço do líquido cefalorraquidiano (LCR), compreendido entre as membranas pia-máter e aracnóide, caracterizando uma hemorragia subaracnóide (HSA) (PULSINELLI, 2001). Esse quadro define uma mudança abrupta e maciça no meio intracraniano em decorrência de hematoma, edema, vasoespasmo e hidrocefalia, não sendo somente uma complicação aguda com potencial risco de vida, mas podendo causar posteriormente incapacidade cognitiva mesmo naqueles pacientes que apresentaram recuperação neurológica (GUARESI et al., 2011). Segundo Mocco et al., (2004), do total de pacientes que sofrem hemorragia subaracnóidea (HSA), apenas um terço volta a sua vida normal. Dentre as sequelas, o paciente pode ficar com distúrbios motores, de cognição e de comportamento.

Essas condições hemorrágicas são definidas como Acidentes Vasculares Encefálicos Hemorrágicos (AVEH). O AVEH é determinado de uma ruptura de um vaso intracraniano que resulta em extravasamento de sangue entre o espaço do líquido cefalorraquidiano (LCR) (hemorragia subaracnóidea), ou dentro do próprio cérebro (hemorragia intracerebral) (SCHAEFER, 2014).

Os AVEH são um importante problema de saúde pública, que se situam entre as quatro maiores causas de morte em muitos países e são responsáveis por uma grande proporção de distúrbios neurológicos. Mais incapacitante que fatal, o AVEH é a principal causa de incapacidade neurológica grave e acarreta custos enormes, medidos tanto em gastos com cuidados de saúde, como em perda de produtividade, destacando-se assim, como um importante problema de saúde pública (ROWLAND, 2002).

Estudos estabeleceram a hipertensão, tabagismo, etilismo, diabetes, índice de massa corporal e idade como preditores confiáveis de risco para AVEH (ROHR et al., 1996; ZHANG et al., 2003). No entanto, esses fatores convencionais de risco para AVEH não contam integralmente para o risco total da doença. Várias vias bioquímicas, incluindo o metabolismo lipídico, regulação da pressão arterial, coagulação e adesão celular, são pensadas a ter papéis críticos na fisiopatologia do curso da doença (WANG et al, 2009). Além disso, estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de acidente vascular cerebral (MATARIN, 2009). Estas evidências apontam que o AVEH é uma doença multifatorial complexa resultante de uma interação entre fatores genéticos e vários fatores ambientais (YAMADA, 2008) (Figura 3).

Riscos modificáveis	Riscos não modificáveis	Outros
Hipertensão	Idade	Álcool
Diabetes	Sexo	Anticorpo antifosfolípideo
Fumo	Raça	Homocisteína elevada
Fibrilação atrial	Etnia	Processo inflamatório
Outras doenças cardíacas	Hereditariedade	Infecção
Hiperlipidemias		
Sedentarismo		
Estenose carotídea assintomática		
Ataques isquêmicos transitórios		

Figura 3: Principais fatores de risco estabelecidos para AVE

Fonte: Revista Brasileira de Hipertensão vol 7 (4): outubro/dezembro de 2000.

1.2. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A boa concepção do sistema vascular é uma condição fundamental para o desenvolvimento e diferenciação de órgãos durante a embriogênese, envolvendo dois processos cruciais: a *vasculogênese*, caracterizada pela diferenciação de células endoteliais progenitoras e a sua montagem no plexo capilar primário; e a *angiogênese*, processo que promove a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). No organismo adulto, a angiogênese continua atuando na manutenção da homeostase e em processos fisiológicos específicos, como cicatrização de feridas e reparação de tecidos, além de implicar na patogênese de uma variedade de distúrbios proliferativos associados à neovascularização, como retinopatias relacionadas com a idade, degeneração macular, tumores, artrite reumatóide, psoríase e outros. (FOLKMAN et al., 1987, 1991; FREITAS et al., 2009).

O fenômeno da angiogênese, elucidado de modo resumido, envolve os seguintes processos: primeiramente ocorre a divisão celular endotelial, seguida pela degradação seletiva da membrana basal e do ambiente circundante da matriz extracelular, posteriormente há a migração de células endoteliais e, por último, a formação de uma nova estrutura tubular (FREITAS et al., 2009). Uma vez que esses novos vasos sanguíneos forem organizados, as células endoteliais sofrem específicas alterações do tecido para gerar funcionalmente outros vasos distintos (HOEBEN et al. 2004).

Recentes evidências apontam que o crescimento e a maturação de novos vasos são processos altamente complexos e coordenados, que exigem a ativação sequencial de uma série de receptores por numerosos ligantes (FERRARA et al., 2003). Um dos participantes primordiais de tais eventos é o **fator de crescimento vascular endotelial** (VEGF, em inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*), uma glicoproteína que desempenha um importante papel regulatório no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis ou sua ausência, quanto o seu aumento provocam danos na formação vascular (FÁTIMA; PAPA, 2010). Ferrara et al. (1996) evidenciou a relevância crítica do VEGF na regulação do crescimento vascular, fisiológico ou patológico, através de estudos realizados em camundongos, no qual percebeu-se que a perda de um único alelo do gene VEGF já é suficiente para observar uma resposta letal para os fetos devido à interrupção do desenvolvimento e diferenciação do sistema vascular. Contudo, sua expressão aumentada de maneira anormal também induziu a morte fetal, devido à hipervascularização e o consequente aumento da quantidade e do volume celular levando a ampliação do tamanho dos tecidos (HANAHAHAN, 1997; STOUFFER et al., 2001).

O VEGF pertence a uma família de polipeptídeos, codificadas por um único gene e constituída por diversos membros, incluindo o fator de crescimento placentário (PGF) (PARK et al., 2004). Esse grupo de proteínas possui uma estrutura característica de nó de cistina, formado por oito resíduos de cisteínas no qual um dímero de duas cisteínas são ligados por pontes dissulfeto (HOLMES; ZACHARY, 2005).

O VEGF apresenta os seguintes subtipos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, tendo o VEGF-A, ou apenas VEGF, o fator de maior relevância por ser o subtipo mais compreendido e estar associado no desenvolvimento vascular em mamíferos e em doenças envolvendo crescimento anormal de vasos sanguíneo (HOLMES; ZACHARY, 2005). O gene dessa glicoproteína é estruturalmente bem conservado, exibindo oito exons, separado por sete introns, e sua região de codificação mede aproximadamente 14 kb (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). A diversidade de éxons entre os subtipos codifica o domínio particular de cada um desses e suas respectivas isoformas, resultadas pelo *splicing alternativo* (HOLMES; ZACHARY, 2005). Essas isoformas diferem na sua massa molecular, de acordo com a quantidade de aminoácidos que cada uma apresenta, e das propriedades biológicas.

O desencadeamento de várias rotas de sinalização intracelular através da ativação do VEGF ocasiona a proliferação, sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, como também sua atuação no aumento da permeabilidade vascular (HICKLIN; ELLIS, 2005; CAPP, 2009).

O VEGF também é caracterizado como fator de permeabilidade vascular (VPF), embasado na sua capacidade de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, resultando no extravasamento de proteínas e outras moléculas plasmáticas a partir dos mesmos (HOLMES; ZACHARY, 2005). O significado fisiológico do efeito de aumento da permeabilidade do VEGF ainda não é totalmente conhecido, porém, Dvorak et al. (1987) propôs em seu estudo que a elevação da permeabilidade microvascular está associada a tumores e feridas, já que o extravasamento pode resultar na formação de um gel de fibrina no meio extravascular, prestando-se como substrato para o crescimento de um tumor endotelial celular. Outros estudos apontam que o VEGF pode induzir fenestrações em células endoteliais. Roberts WG e Palade (1995) verificaram através administração tópica do VEGF, o desenvolvimento agudo de fenestrações no endotélio de vênulas e capilares pequenos, mesmo em regiões onde as células endoteliais não são normalmente fenestradas, está associado ao aumento da permeabilidade vascular (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

O VEGF atua diretamente ao se ligar e ativar os receptores de membranas nas células endoteliais. Esses receptores (VEGFR) são mediados por uma família de proteína tirosina quinase, que agrupam os seguintes receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, além do domínio extracelular do VEGFR-1 (Flt-1, em inglês: *fms like tyrosine-kinase receptor-1*), o qual é expresso como uma proteína solúvel. Cada um dos subtipos pode ativar um ou mais receptores (ROY et al., 2006; FREITAS et al., 2009).

O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas do tecido, macrófagos e monócitos, bem como endotélio vascular, já o VEGFR-2 e o VEGFR-3, são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente (ROY et al., 2006).

Os VEGFR possuem distintas propriedades físicas e biológicas além de expressarem atividade tirosina quinase (TK). As proteínas tirosina quinase (PTK) são enzimas que efetuam o processo de fosforilação através da catalisação da transferência do grupo fosfato da adenosina tri-fosfato (ATP) para resíduos tirosina de outras proteínas ou polipeptídios, garantindo a manutenção da homeostase celular.

Essas enzimas são mediadoras cruciais no processo de transdução de sinal, o que leva à proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular programada (MANASH; MUKHOPADHYAY, 2004; CAPP, 2009).

1.3. Polimorfismo do VEGF

A maior parte do DNA de qualquer indivíduo, por volta de 99,5%, é exatamente a mesma comparada com qualquer outro indivíduo (GOLDSTEIN; CAVALLERI, 2005). Porém, entre os seres humanos, há variações genéticas na sequência de DNA, no nível dos pares de bases nitrogenadas, que resultam em uma grande diversidade de características particulares, no qual, essas diferenças são denominadas de polimorfismos. Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1% (SCHAFER; HAWKINS, 1998). Supõe-se que a cada 500 pares de base (pb) ocorra uma variação no DNA humano (FEERO; GUTTMACHER; COLLINS, 2010).

O nosso genoma é composto por milhões de polimorfismos, consequentemente o número de estudos genéticos que buscam avaliar a associação dessas variações com determinadas doenças também é expressivo. Diferenças individuais quanto a sensibilidade e a gravidade de uma doença podem ser explicadas pela relação de polimorfismos funcionais que gera efeitos sobre a regulação da expressão de um gene (KRIPPL et al., 2003; LIN et al., 2003). O estudo e identificação sistemática de polimorfismos de DNA presentes no genoma humano geram subsídios importantes para a elucidação do componente genético da maioria dos fenótipos clínicos e não-clínicos (GOLDSTEIN; CAVALLERI, 2005). Um dos métodos utilizados são os estudos genéticos de associação, no qual se analisa amostras de indivíduos afetados e não afetados por uma fisiopatologia dentro de uma população (COSTA et al, 2007).

O gene VEGF está localizado no cromossomo 6 (6p21.3) (VINCENTI et al., 1996), e é um gene altamente polimórfico (BURACZYNSKA et al., 2007) (Figura. As variações genéticas do gene podem influenciar diretamente os níveis de expressão da proteína VEGF (WATSON et al., 2000). Diversos polimorfismos no VEGF são relacionados com os níveis de expressão desse fator, dentre eles a deleção/ inserção

do fragmento de 18 pb na posição -2549 da região promotora (VEGF -2549 18pb D/I) (Figura 4). Vários estudos analisaram o polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I no contexto da susceptibilidade a várias doenças, com a apresentação de resultados díspares entre eles.

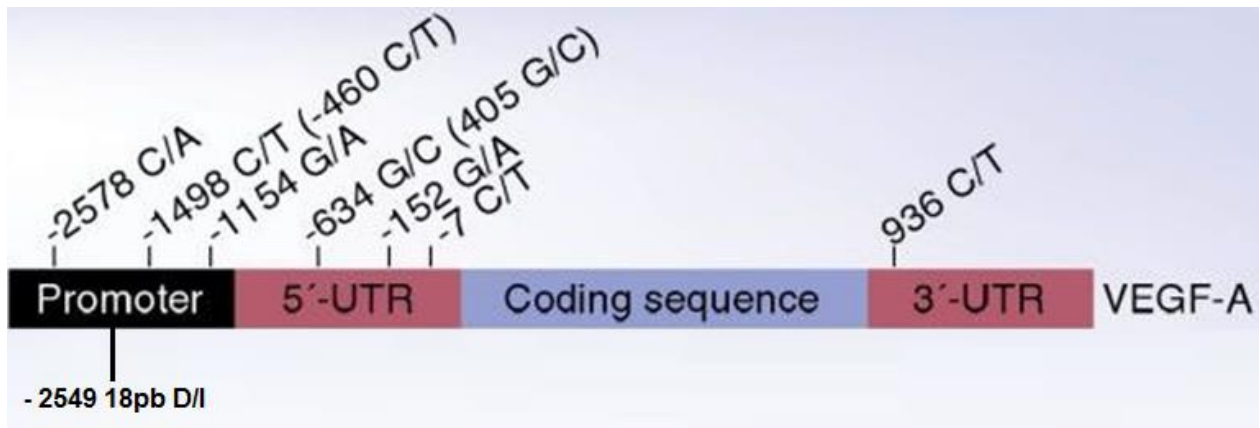


Figura 4: Gene VEGF com destaque da sua região promotora na qual localiza-se o polimorfismo alvo da análise (-2549 18pb D/I).

Fonte: Figura modificada de http://www.medscape.com/viewarticle/754568_2

Embora o gene VEGF seja extremamente polimórfico, e sendo este um importante mediador da homeostase vascular, não há nenhum estudo que tenha demonstrando a implicação funcional do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I relacionado à susceptibilidade de acometimento de aneurisma intracerebral ou acidente vascular encefálico hemorrágico.

2. JUSTIFICATIVA

Como os elementos de risco que contribuem para a manifestação do aneurisma intracerebral ou acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) em indivíduos não se restringem a condições externas, mas também àsquelas de base genética, este trabalho buscou avaliar a relação entre o polimorfismo na região promotora (posição -2549 18pb D/I) do gene do VEGF em amostras de pacientes acometidos por tais fisiopatologias, visto a importância do VEGF na manutenção da integridade dos vasos sanguíneos.

Esse estudo tem efeito e aplicabilidade na colaboração para maiores esclarecimentos sobre os fatores genéticos que favorecem o aparecimento destas doenças, auxiliando um prognóstico mais rápido e efetivo. Visto que é relevante ressaltar que não há demais trabalhos que relacionem o polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I) em pacientes acometidos com aneurisma intracerebral ou AVEH.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a correlação do polimorfismo genético da região promotora do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (-2549 18pb D/I) em pacientes acometidos com acidente vascular encefálico hemorrágico ou aneurisma intracerebral.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Identificar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I em indivíduos portadores de acidente vascular encefálico hemorrágico ou aneurisma intracerebral atendidos em um hospital do Distrito Federal – Brasil.

3.2.2. Comparar as frequências alélicas e genotípicas com aquelas observadas em indivíduos não portadores de doenças crônicas, habitantes da mesma região, e promover, desta forma, um estudo de caso-controle.

3.2.3. Investigar aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes portadores da patologia, fazendo comparação com os indivíduos do grupo controle, quando for o caso.

3.2.4. Identificar a frequência do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I quanto a avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes através de escalas avaliativas (Escala de Glasgow, Escala de Rankin, *NIHSS* e Índice de Barthel).

4. METODOLOGIA

4.1 Indivíduos estudados

Foram analisadas 103 amostras de indivíduos doentes, sendo 33 deles acometidos com aneurisma intracerebral e 70 com AVEH, atendidos no setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília. Ainda, foram analisados 33 indivíduos controles saudáveis. Após a autorização concedida, 10 mL de amostra de sangue de cada sujeito foi colhido através de punção de veia periférica com material novo e descartável, seguindo as normas de biossegurança. A coleta de sangue foi praticada pela equipe de enfermagem responsável do setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília. O material biológico dos participantes foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde foi estocado. Posteriormente o DNA extraído dessas amostras foi endereçado para o Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Farmácia da Faculdade de Ceilândia onde houve a execução da avaliação do polimorfismo na posição -2549 (18pb D/I) do gene do VEGF.

O presente estudo foi, preliminarmente, submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Anexo 1). Juntamente também com a obtenção da ficha de identificação dos participantes da pesquisa (Anexo 2), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3), e o termo de guarda de material biológico (Anexo 4) autorizados pelo próprio paciente ou responsável.

4.2 Classificação dos pacientes

Diversas escalas são utilizadas nos serviços de saúde, principalmente naqueles de caráter emergencial, durante o manejo clínico de pacientes acometidos por um acidente vascular encefálico (AVE), sendo esse isquêmico ou hemorrágico, com o intuito de classificar, de forma padronizada, o comprometimento neurológico do indivíduo, através da avaliação da gravidade, do tipo e da localização do AVE. Tais escalas ainda são aplicadas na prática da reabilitação, em pesquisas para diagnósticos e prognósticos e também na resposta a tratamentos (BRITO et al, 2013). Essas ferramentas auxiliam tanto na observação da evolução do quadro clínico do paciente,

quanto na comunicação entre os profissionais de saúde envolvidos na terapia do mesmo. Para garantir o sucesso de cada método, é preciso treinamento e uso contínuo da escala pela equipe de saúde para garantir a confiabilidade e precisão esperada de cada escala (OLIVEIRA; PEREIRA; FREITAS, 2014).

A escala de coma de Glasgow (ECG) é um instrumento clínico de destaque que possibilita uma abordagem padrão e universal diante da medição do nível de consciência de pacientes acometidos por algum traumatismo encefálico através da observação comportamental, fundamentando-se em valores numéricos (ANEXO 5). A ECG avalia a resposta do paciente diante da observação de três critérios: abertura ocular, reação motora e resposta verbal. Após as seis primeiras horas do sofrimento traumático, esta avaliação é aplicada. Cada item dentro dos três critérios da escala recebe um escore, variando de 3 a 15, sendo que o escore 15 representa o nível de consciência normal e o escore 3 corresponde a morte cerebral. A soma dos três valores constitui o resultado final da escala de Glasgow (OLIVEIRA; PEREIRA; FREITAS, 2014).

Outra ferramenta que apresenta níveis de evidência de confiabilidade clinicamente aceitáveis e de boa aplicabilidade é a Escala Modificada de Rankin (ERm) tendo objetivo de verificar o grau de incapacidade e dependência nas tarefas cotidianas em pacientes após um AVE. A divisão dessa escala ocorre em seis graus, no qual o grau 0 traduz nenhum sintoma residual e nenhuma incapacidade consequente da patologia, o grau 5 já representa àqueles com incapacidade severa, e o grau 6 equivale ao óbito do indivíduo (BRITO et al., 2013). A escala é baseada em dois parâmetros: a incapacidade global (particularmente a incapacidade física) e a necessidade de auxílio para realizar atividades instrumentais e básicas da vida diária com foco no comprometimento motor (BRUNO; SWITZER, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1: Escala de Rankin modificada (ERm).

Grau	Descrição
0	Sem sintomas
1	Nenhuma incapacidade significativa; a despeito dos sintomas; capaz de conduzir todos os deveres e atividades habituais.
2	Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém é independente para os cuidados pessoais.
3	Incapacidade moderada; requer alguma ajuda mas é capaz de caminhar sem assistência (pode usar bengala ou andador).
4	Incapacidade moderadamente severa; incapaz de caminhar sem assistência e incapaz de atender às próprias necessidades fisiológicas sem assistência.
5	Deficiência grave; confinado à cama, incontinente, requerendo cuidados e atenção constante de enfermagem.
6	Óbito

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2009.

A escala do *National Institutes of Health Stroke (NIHSS)*, é reconhecida como um dos instrumentos avaliativos de maior aplicabilidade a nível internacional, por ser uma escala validada e fiável, analisando a função neurológica dos indivíduos acometidos por AVC, indicando o tamanho e gravidade da lesão, bem como do prognóstico desses (SIM, 2008). A *NIHSS* apresenta 11 itens que referem-se ao nível de consciência, linguagem, fala, somatognosia, campo visual, movimentação ocular, força, coordenação motora e sensibilidade (BROTT et al., 1989). A pontuação de cada item pode variar de 0 a 42, desde da inexistência de déficit neurológico até a certificação de um estado em coma do paciente, respectivamente. A escala *NIHSS* pode ser então estratificada com o intuito de constatar a gravidade da doença, sendo que até 3 pontos, o comprometimento neurológico é leve; já de 4 a 15 pontos, há um comprometimento moderado, e acima de 15 pontos, o prejuízo pós-AVE é grave (CLARK; HOURIHANE, 1997) (Tabela 2).

Tabela 2: Interpretação das pontuações na escala NIHSS.

Comprometimento neurológico	Pontuação
Déficit leve	0 – 5
Déficit moderado	5 – 17
Déficit grave	17 – 22
Déficit muito grave	> 22

Fonte: <http://www.cuidadosintensivos.net/ficheiros/outros-files/escala-nihss.pdf>

O Índice de Barthel é outro instrumento bastante utilizado na ponderação das atividades da vida diária relacionada à independência funcional e a mobilidade do indivíduo. Essa ferramenta é atribuída tanto no prognóstico pós-AVE quanto na observação de demais desordens neurológicas, com resultados de confiabilidade e validade plausíveis e seguros. São avaliados dez itens: alimentação, higiene pessoal, banho, uso do banheiro, controle de esfíncteres anal e vesical, vestir-se e despir-se, transferências (cama e cadeira), movimentação (subir e descer escadas), deambulação. Na pontuação do Índice de Barthel, atribui-se valores numéricos dentro de cada categoria, variando de 0 a 100, em intervalos de cinco pontos, no qual, as pontuações menores (abaixo de 50) indicam dependência pelo paciente (MINOSSO et al., 2010; SEQUEIRA, 2007) (Anexo 6).

As escalas de Glasgow, Rankin, *NIHSS* e o Índice de Barthel foram utilizados para análise nos grupos de pacientes do estudo nas comparações com o polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I).

4.3 Polimorfismo do VEGF (-2549 18pb D/I)

A reação de amplificação para região (posição -2549) onde está localizada a deleção/inserção de 18pb no gene do VEGF foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês: *Polymerase Chain Reaction*). A sequência dos *primers* está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores para detecção do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I).

Iniciadores	Sequências (5'-3')
VEGF- 2549 forward (F)	GCTGAGAGTGGGGCTGACTAGGTA
VEGF- 2549 reverse (R)	GTTTCTGACCTGGCTATTTCCAGG

O DNA genômico de cada amostra foi amplificado para um volume final de 10 µL, respeitando o protocolo de reação exposto na Tabela 4.

Tabela 4: Protocolo da reação de PCR.

Reagente	Concentração do uso	Concentração para cada reação	µL para cada reação
Tampão	10X	1X	1,0
MgCl ₂	50 Mm	2,5 mM	0,5
DNTP	2,5 Mm	0,25 mM	0,1
Primer VEGF (F)	10 pM/µL	5 pM/µL	0,5
Primer VEGF (R)	10 pM/µL	5 pM/µL	0,5
Taq-Polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA	25 ng	100 ng	4,0
Água Milli-Q	-	-	3,2

Finalizada a etapa de preparo, estas amostras eram logo submetidas à técnica de PCR, seguindo as condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições de amplificação do VEGF (-2549 18pb D/I).

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
95	5'	1x
94	1'	35x
59	1'	
72	1' 30''	
72	10'	1x
4	∞	

Todas as PCRs foram executadas no termociclador Bioer life express®. Antes das amostras de DNA serem submetidas à eletroforese, adicionou-se tampão de

corrida de amostra (azul de bromofenol (5 μ L)) e GelRed™ (0,3 μ L). Em seguida, os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (preparado com uma solução não-desnaturante 10% (15 ml) + solução de persulfato de potássio (370 μ L) e TEMED (14 μ L)), sob voltagem de 120 V por aproximadamente 2 horas. A análise da eletroforese foi realizada em fotodocumentador sob luz UV.

4.4 Análise estatística

Após a coleta dos dados, os mesmos foram codificados, criando-se um banco de dados em *Excel*.

As comparações de dois grupos (paciente e indivíduos controle) e de suas respectivas variáveis como: gênero, diabetes, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo e etilismo, foram realizadas pelo teste exato de Fisher utilizando-se o *software GraphPad InStat 3.06* (INC, 1998). Para comparações de mais de dois grupos (aneurisma, AVEH e indivíduos controle) as variáveis gênero, diabetes, HAS, tabagismo e etilismo, com valores absolutos com tabela de contingência maior que 2x2, o teste exato foi realizado utilizando o algoritmo *Metropolis* (MET) para obter uma estimativa imparcial do exato valor de p para uma determinada tabela de contingência RXC .

Amplitudes de variação, médias e desvios-padrão das variáveis contínuas (idade) foram estimadas utilizando-se novamente o *software GraphPad InStat 3.06* (INC., 2003). Para a comparação de médias entre 2 grupos (paciente e indivíduos controle), foram aplicados os testes *t de Student* (paramétrico) ou *Mann-Whitney* (não-paramétrico) bicaudais. A comparação de médias entre 3 grupos foi realizada por meio das análises de *ANOVA* (paramétrica) seguido do pós testes de *Tukey*, ou *Kruskal-Wallis* (não-paramétrica), seguido do pós testes de *Dunn*. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não-paramétricos foi baseada no resultado do teste *Kolmogorov-Smirnov* de normalidade.

A determinação das frequências alélicas e genotípicas foi calculada pela contagem direta em *Excel*.

Já a comparação de frequências alélicas ou genotípicas absolutas entre grupos, para identificar eventuais associações, foi feita por meio do teste exato de Fisher bicaudal com auxílio do *software GraphPad InStat 3.06* (INC., 2003). A

magnitude das associações (susceptibilidade ou resistência) foi determinada pelo cálculo de *Odds Ratio* (OR), acompanhado de intervalo de confiança de 95% (I.C. 95%) ambas realizadas utilizando-se o *software GraphPad InStat 3.06* (INC, 1998).

A análise do teste exato de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi realizada pelo *genepop on the web* (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html genepop).

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes e indivíduos saudáveis

As características clínicas e demográficas dos pacientes com Aneurisma Intracerebral e AVEH, e indivíduos saudáveis (grupo controle) estudados, estão especificadas na Tabela 6. Em relação ao gênero dos participantes, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos aneurisma/AVEH/indivíduos saudáveis, mas sim quando esse fator foi comparado entre o grupo total de pacientes (aneurisma intracerebral + AVEH) vs. indivíduos saudáveis ($p = 0,0220$) sendo observados mais indivíduos do sexo feminino do que masculino no grupo total de pacientes; o contrário foi observado no grupo indivíduos saudáveis.

Com relação à média de idade, foram realizadas comparações entre os grupos aneurisma/AVEH/indivíduos saudáveis e entre o grupo total de pacientes vs. indivíduos saudáveis, não sendo observadas diferenças entre essas comparações, não sendo encontrado resultado significativo diante de tais verificações, garantido homogeneidade entre os grupos estudados quanto à idade.

Quanto às condições clínicas preditoras do desencadeamento/agravamento do aneurisma intracerebral e AVEH, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em apresentar diabetes, ter hábitos de tabagismo e etilismo. Mas a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS) mostrou significância estatística entre os grupos aneurisma /AVEH /indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$), o fundamento dessa diferença é atribuída à comparação entre os grupos aneurisma vs. indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$) e também entre os grupos AVEH vs. indivíduos saudáveis; ($p < 0,0001$). A comparação entre o grupo total de pacientes vs. indivíduos saudáveis também apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$).

Tabela 6: Características clínicas e demográficas dos pacientes e indivíduos saudáveis.

	Pacientes			Indivíduos saudáveis	p-valores da comparação entre:	
	Aneurisma	AVEH	Total		Aneurisma / AVEH / Indivíduos saudáveis ^I	Pacientes total / Indivíduos saudáveis ^{II}
Gênero	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 33)		
Masculino / Feminino	12 / 21	29 / 41	31 / 62	19 / 14	0,1800 (MET)	0,0220 (FET) ^a
Idade	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 33)		
Média (anos) ± Desvio Padrão	52,33 ± 9,564	55,57 ± 7,753	54,53 ± 8,465	52,42 ± 5,081	0,1612 (KW)	0,0566 (MW)
Intervalo (anos)	23 – 63	42 – 74	23 – 74	46 – 65		
Diabetes	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 33)	0,0730 (MET)	1,0000 (FET)
Sim / Não	2 / 31	0 / 70	2 / 101	0 / 15		
HAS	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 33)	<0,0001 ^b (MET)	<0,0001 ^c (FET)
Sim / Não	24 / 9	50 / 20	74 / 29	2 / 18		
Tabagismo	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 20)	0,8310 (MET)	0,8065 (FET)
Sim / Não	14 / 19	26 / 44	40 / 63	7 / 13		
Etilismo	(n = 33)	(n = 70)	(n = 103)	(n = 20)	0,3620 (MET)	0,7948 (FET)
Sim / Não	6 / 27	22 / 48	28 / 52	6 / 14		

^I Comparação entre os três grupos (Aneurisma / AVEH / Indivíduos saudáveis) analisadas por *one-way ANOVA* seguida de múltiplas comparações pós teste, *Tukey*, *Kruskal-Wallis test* (KW) seguido de múltiplas comparações pós teste, *Dunn's*, ou por teste exato que aplica *Metropolis algorithm* (MET) para obter um estimativa imparcial do exato valor de para uma dada tabela de contingência RxC (no caso de reveladas diferenças significativas por esta ultima análise, comparações pós teste *pair-wise* foram feitas com teste exato de Fisher).

^{II} Comparações entre os grupos (pacientes e indivíduos saudáveis) feitas por media ou teste-t bicaudal, media *Mann-Whitney* (MW) ou teste exato de Fisher bicaudal (FET).

^a Teste exato de Fisher bicaudal (FET), $p = 0,0220$; *Odds ratio* = 0,3684 intervalo de confiança 95% = 0,1632 a 0,8316.

^b Comparação *Metropolis algorithm* (MET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma / AVEH / indivíduos saudáveis ($p < 0,001$). Comparações pós teste *pair-wise* feitas com teste exato de Fisher revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. indivíduos saudáveis; $p < 0,0001$; *Odds ratio* = 24,00; intervalo de confiança 95% = 4,609 a 125,0 e entre os grupos AVEH vs. indivíduos saudáveis; $p < 0,0001$; *Odds ratio* = 22,50; intervalo de confiança 95% = 4,773 a 106,1.

^c Teste exato de Fisher bicaudal (FET), $p < 0,0001$; *Odds ratio* = 22,97; intervalo de confiança 95% = 5,008 a 105,3.

A Tabela 7 expõe características clínicas e comparações entre os pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral e por AVEH, de acordo com escalas avaliadoras de comprometimento neurológico: Glasgow, Rankin, NIHSS e Índice de Barthel.

Nota-se que existiram diferenças estatísticas significantes em todas as escalas avaliadoras. Na Escala de Glasgow, o escore 15, que determina o valor de consciência normal de pacientes, apresentou resultado significativo ($p = 0,0045$). Já na Escala de Rankin, o grau 0 (sem sintomas) e o grau 1 (nenhuma incapacidade significativa) demonstrou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,0132$) e ($p = 0,0048$), respectivamente. É possível observar

que houve diferença estatística na Escala NIHSS nas pontuações 1 ($p = 0,0309$) e 6 ($p = 0,0027$). Por fim, os resultados obtidos a partir do índice de Barthel apresentaram diferença estatística na pontuação 80 ($p = 0,0041$) como também na pontuação 95 da escala ($p < 0,0001$).

Tabela 7: Características clínicas de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral ou AVEH.

Avaliações de déficit neurológico e dependência funcional	Aneurisma	AVEH	P-valores da comparação entre: Aneurisma / AVEH ¹
Escala de Glasgow	(n = 33)	(n = 68)	
8	0	3	0,5489 (FET)
9	0	4	0,3004 (FET)
12	0	4	0,3004 (FET)
13	0	2	1,0000 (FET)
15	33	55	0,0045 ^a (FET)
Escala de Rankin	(n = 33)	(n = 70)	
0	3	15	0,0132 ^b (FET)
1	25	18	0,0048 ^c (FET)
2	1	2	1,0000 (FET)
3	4	3	0,4595 (FET)
4	0	1	1,0000 (FET)
5	0	4	0,1281 (FET)
NIHSS	(n = 33)	(n = 70)	
0	14	25	0,5223 (FET)
1	3	0	0,0309 ^d (FET)
2	5	9	0,7641 (FET)
3	3	14	0,2552 (FET)
4	3	9	0,7474 (FET)
6	5	0	0,0027 ^e (FET)
17	0	1	1,0000 (FET)
18	0	7	0,0936 (FET)
20	0	4	0,3030 (FET)
21	0	1	0,5223 (FET)
Índice de Barthel	(n = 33)	(n = 70)	
0	0	3	0,5494 (FET)
2	0	4	0,3030 (FET)
5	0	2	1,0000 (FET)
10	0	4	0,3030 (FET)
40	0	2	1,0000 (FET)
70	0	6	0,1732 (FET)
73	0	4	0,3030 (FET)
80	6	1	0,0041 ^f (FET)
90	3	9	0,7474 (FET)
95	10	0	< 0,0001 ^g (FET)
100	14	35	0,5298 (FET)

Comparações entre os grupos pacientes (aneurisma e AVEH) feitas aplicando-se o teste exato de Fisher bicaudal (FET) individual para cada nível de cada escala

^a Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 15 de Glasgow; $p = 0,0045$; *Odds ratio* = 16,30; intervalo de confiança 95% = 0,9373 a 283,4;

^b Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 0 de Rankin; $p = 0,0132$; *Odds ratio* = 0,1867; intervalo de confiança 95% = 0,04875 a 0,7148;

^c Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 1 de Rankin; $p = 0,0048$; *Odds ratio* = 4,340; intervalo de confiança 95% = 1,596 a 11,81;

^d Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 1 de NIHSS; $p = 0,0309$; *Odds ratio* = 16,18; intervalo de confiança 95% = 0,8102 a 323,1;

^e Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 6 de NIHSS; $p = 0,0027$; *Odds ratio* = 27,21; intervalo de confiança 95% = 1,455 a 508,7;

^f Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 80 de Barthel; $p = 0,0041$; *Odds ratio* = 15,33; intervalo de confiança 95% = 1,762 a 133,5;

^g Comparações o teste exato de Fisher bicaudal (FET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH para a escala 95 de Barthel; $p < 0,0001$; *Odds ratio* = 63; intervalo de confiança 95% = 3,551 a 1118.

5.2 Frequência alélica e genotípica

A figura 5 ilustra um dos géis de poliácridamida 10%, corado com GelRed™ no qual identifica-se o marcador de peso molecular de 100 pb utilizado e as amplificações do polimorfismo VEGF(-2549 18pb D/I). A banda de 229 pb representa uma inserção homozigótica de 18 pb (VEGF 18pbII - amostra 1), já a banda de 211 pb evidencia uma deleção homozigótica de 18 pb (VEGF 18pbDD – amostras 2, 3 e 5), e a presença de ambas as bandas (229 pb e 211 pb) indica uma heterozigosidade daquela amostra (VEGF 18pbDI – amostra 4).

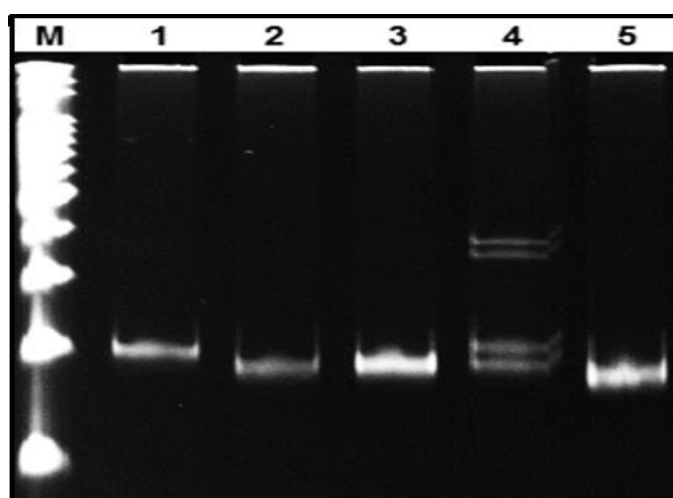


Figura 5: Gel de poliácridamida de cinco amostras distintas de pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral. M) marcador de peso molecular de 100pb*; 1) Homozigose VEGF 18pbII; 2, 3 e 5) Homozigose VEGF 18pbDD; 4) Heterozigose VEGF 18pbDI.

* O marcador de peso molecular utilizado foi o de 100pq @KASVI.

Na tabela 8, e no gráfico 1 (Anexo 7), estão representadas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I, juntamente com os valores de p , demonstrando as comparações entre esses grupos pelo teste exato de Fisher e ainda os valores de p do teste de Hardy-Weinberg (p HWE) dos distintos grupos de pacientes e indivíduos saudáveis. Nesta, percebe-se uma maior frequência do alelo VEGF -2549 18pbD e menor frequência do alelo VEGF -2549 18pbI no grupo de pacientes acometidos por AVEH e consequentemente no grupo total de pacientes comparado com grupo controle saudável ($p = 0,0345$ e $p = 0,0300$ respectivamente). Quanto aos genótipos (gráfico 2 - Anexo 7), observa-se maior frequência do genótipo VEGF -2549 18pbDD no grupo Aneurisma comparado ao grupo controle saudável ($p = 0,0414$), consequentemente a frequência do genótipo VEGF -2549 18pbDD também foi maior no grupo total de pacientes que no grupo controle saudável ($p = 0,0262$).

Também pode se observar que, apesar de não ser estatisticamente significativa, o genótipo VEGF -2549 18pbII é mais frequente no grupo controle saudável que no grupo AVEH. Não houve diferenças significativas nas comparações alélicas e genotípicas entre os grupos AVEH e Aneurisma.

Tabela 8: Frequências alélicas e genotípicas, e valores de p do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

GRUPOS DE PACIENTES	n	ALELOS		p HWE	GENÓTIPOS		
		D	I		DD	DI	II
Aneurisma	33	0,6364	0,3636	0,0076	0,5152 ^c	0,2424	0,2424
AVEH	70	0,6429 ^a	0,3571 ^a	0,3067	0,4429	0,4000	0,1571
Pacientes total (Aneurisma + AVEH)	103	0,6408 ^b	0,3592 ^b	0,0171	0,4660 ^d	0,3495	0,1845
Controle saudável	33	0,4848 ^{ab}	0,5152 ^{ab}	1,0000	0,2424 ^{cd}	0,4848	0,2727

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa Excel.

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^a Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0345$; Odds ratio = 2,591; intervalo de confiança de 95% = 1,056 a 3,464;

^b Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0300$; Odds ratio = 1,895; intervalo de confiança de 95% = 1,082 a 3,320;

^c Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0414$; Odds ratio = 3,320; intervalo de confiança de 95% = 1,163 a 9,479;

^d Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0262$; Odds ratio = 2,727; intervalo de confiança de 95% = 1,125 a 6,611.

De acordo com o teste de Hardy-Weinberg foi observado que o grupo aneurisma e consequentemente o grupo pacientes total se encontraram em desequilíbrio, $p = 0,0076$ e $p = 0,0171$ respectivamente.

Outra análise efetuada foi a da frequência alélica e genotípica do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I em relação as escalas avaliadoras do grau de comprometimento dos pacientes acometidos com aneurisma intracerebral (Tabela 9) e AVEH (Tabela 10) (Escala de Glasgow, Escala de Rankin, NIHSS e Índice Barthel) (gráficos 3 a 18 - Anexo 7).

Quanto aos pacientes que sofreram aneurisma intracerebral, de todas as comparações possíveis realizadas entre as escalas do estudo, encontramos diferença estatisticamente significativa na frequência alélica em relação à Escala de Rankin, em que o alelo VEGF-2549 18pbD apresentou maior frequência e o alelo VEGF -2549 18pbI menor frequência no grau 3 comparado com o grau 1 ($p = 0,0003$) (gráfico 5 - Anexo 7).

Ainda em relação aos indivíduos acometidos com aneurisma intracerebral, foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes graus da escala NIHSS. Observamos maior frequência do alelo VEGF -2549 18pbD e menor frequência do alelo VEGF -2549 18pbl na escala 0 que na escala 3 ($p = 0,0003$) e na escala 6 ($p = 0,0193$) (gráfico 7 - Anexo 7). Como na escala 3 todos os indivíduos apresentaram o alelo VEGF -2549 18pbl, encontrou-se diferença estatística entre alelos dessa escala com as escalas 1 ($p = 0,0152$) e 4 ($p = 0,0152$). Quanto as comparações genotípicas da escala NIHSS em pacientes que sofreram aneurisma intracerebral, observou-se exclusividade do genótipo VEGF -2549 18pbll na escala 3, que demonstrou diferença estatística quando comparada com a escala 0 ($p = 0,0059$) (gráfico 8 - Anexo 7).

As frequências alélicas e genotípicas entre os instrumentos de avaliação estabelecidos no estudo também foram analisadas em pacientes pós-AVEH, manifestando algumas diferenças estatisticamente significantes na escala NIHSS. Atentou-se que houve significância estatística com maior frequência do alelo VEGF-2549 18pbD e menor frequência do alelo VEGF-2549 18pbl na escala 0 que nas escalas 2 e 4 (gráfico 15 - Anexo 7). Ainda observou-se maior frequência do genótipo VEGF -2549 18pbDD na escala 0 comparado com a escala 2 ($p = 0,0189$) (gráfico 16 - Anexo 7).

Tabela 9: Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral:

Escalas avaliadoras de déficit neurológico e dependência funcional	N	ALELOS		GENOTIPOS		
		D	I	DD	DI	II

ANEURISMA INTRACEREBRAL						
Escala de Glasgow						
15	33	0,6364	0,3636	0,5152	0,2424	0,2424
Escala de Rankin						
0	3	0,8333	0,1667	0,6667	0,3333	0,0000
1	25	0,5800 ^a	0,4200 ^a	0,4400	0,2800	0,2800
3	4	1,0000 ^a	0,0000 ^a	1,0000	0,0000	0,0000
NIHSS						
0	14	0,8214 ^{bc}	0,1786 ^{bc}	0,7143	0,2143	0,0714 ^f
1	3	0,8333 ^d	0,1667 ^d	0,6667	0,3333	0,0000
2	5	0,5000	0,5000	0,4000	0,2000	0,4000
3	3	0,0000 ^{bde}	1,0000 ^{bde}	0,0000	0,0000	1,0000 ^f
4	3	0,8333 ^e	0,1667 ^e	0,6667	0,3333	0,0000
6	5	0,4000 ^c	0,6000 ^c	0,2000	0,4000	0,4000
Índice de Barthel						
80	6	0,5833	0,4167	0,5000	0,1667	0,3333
90	3	0,8333	0,1667	0,6667	0,3333	0,0000
95	10	0,4500	0,5500	0,3000	0,3000	0,4000
100	14	0,7500	0,2500	0,6429	0,2143	0,1429

Cálculo das frequências alélicas e genóticas em programa *Excel*.

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^a Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0413$; *Odds ratio* = 0,08071; intervalo de confiança de 95% = 0,004412 a 1,476;

^b Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0003$; *Odds ratio* = 55,55; intervalo de confiança de 95% = 2,702 a 1142;

^c Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0193$; *Odds ratio* = 6,900; intervalo de confiança de 95% = 1,403 a 33,93;

^d Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0152$; *Odds ratio* = 47,67; intervalo de confiança de 95% = 1,596 a 1424;

^e Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0152$; *Odds ratio* = 0,02098; intervalo de confiança de 95% = 0,0007023 a 0,6267;

^f Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0059$; *Odds ratio* = 0,01587; intervalo de confiança de 95% = 0,0005242 a 0,4807.

Tabela 10: Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis de diferentes avaliações de déficit neurológico e dependência funcional dos pacientes acometidos com AVEH:

Escalas avaliadoras de déficit neurológico e dependência funcional	n	ALELOS		GENOTIPOS		
		D	I	DD	DI	II

AVEH						
Escala de Glasgow						
8	3	0,5000	0,5000	0,3333	0,3333	0,3333
9	4	0,6250	0,3750	0,5000	0,2500	0,2500
12	4	0,6250	0,3750	0,5000	0,2500	0,2500
13	2	0,5000	0,5000	0,0000	1,0000	0,0000
15	55	0,6545	0,3455	0,4545	0,4000	0,1455
Escala de Rankin						
0	22	0,7500	0,2500	0,5909	0,3182	0,0909
1	25	0,5800	0,4200	0,3200	0,5200	0,1600
2	4	0,5000	0,5000	0,2500	0,5000	0,2500
3	4	0,7500	0,2500	0,7500	0,0000	0,2500
4	8	0,6250	0,3750	0,3750	0,5000	0,1250
5	7	0,5714	0,4286	0,4286	0,2857	0,2857
NIHSS						
0	25	0,7800 ^{gh}	0,2200 ^{gh}	0,6000 ⁱ	0,3600	0,0400
2	9	0,4444 ^g	0,5556 ^g	0,1111 ⁱ	0,6667	0,2222
3	14	0,6429	0,3571	0,5000	0,2857	0,2143
4	9	0,5000 ^h	0,5000 ^h	0,2222	0,5556	0,2222
17	1	0,5000	0,5000	0,0000	1,0000	0,0000
18	7	0,5714	0,4286	0,4286	0,2857	0,2857
20	4	0,6250	0,3750	0,5000	0,2500	0,2500
21	1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Índice de Barthel						
0	3	0,5000	0,5000	0,3333	0,3333	0,3333
2	4	0,6250	0,3750	0,5000	0,2500	0,2500
5	2	0,7500	0,2500	0,5000	0,5000	0,0000
10	4	0,6250	0,3750	0,5000	0,2500	0,2500
40	2	0,5000	0,5000	0,0000	1,0000	0,0000
70	6	0,7500	0,2500	0,6667	0,1667	0,1667
73	4	0,3750	0,6250	0,0000	0,7500	0,2500
80	1	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
90	9	0,6667	0,3333	0,4444	0,4444	0,1111
100	35	0,6571	0,3429	0,4571	0,4000	0,1429

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa Excel.

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^g Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0156$; *Odds ratio* = 4,432; intervalo de confiança de 95% = 1,409 a 13,94;

^h Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0359$; *Odds ratio* = 3,545; intervalo de confiança de 95% = 1,133 a 11,10;

ⁱ Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0189$; *Odds ratio* = 12,00; intervalo de confiança de 95% = 1,293 a 111,4.

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos com polimorfismo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na posição -2549 (18pb D/I) e sua possível associação à susceptibilidade a inúmeras doenças já foram realizados, porém os resultados destes são distintos entre si, considerando que as influências do polimorfismo distinguem-se entre as diversas patologias. A associação do genótipo VEGF -2549 18pbDD foi relatado com a retinopatia diabética (AWATA et al., 2002; BURACZYNSKA et al., 2007), a nefropatia diabética (YANG et al., 2003) e a doença arterial periférica (BLADA et al., 2012). Contudo, uma alta frequência do genótipo VEGF -2549 18pbID tem sido observada em esclerose sistêmica (ALLANORE et al., 2007) e cancro da próstata (GEORGE; MITTAL, 2011). Um estudo feito por Kapahi et al., 2013, em relação a possível associação do polimorfismo VEGF (-2549 18pb D/I) com um risco de câncer de mama em pacientes do estado de Punjab, na Índia, mostrou que há uma frequência significativamente maior do genótipo VEGF -2549 18pbII nos pacientes acometidos por essa doença. Destaca-se que a análise de uma possível associação do polimorfismo genético VEGF (-2549 18pb D/I) em pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral e/ou em pacientes acometidos com AVEH é inovadora em relação a tal polimorfismo.

De acordo com o presente trabalho, observamos que quanto aos aspectos clínicos e demográficos dos indivíduos, houve significância estatística em relação ao gênero diante da comparação entre o grupo de pacientes total vs. indivíduos saudáveis. Portanto, nosso grupo total de pacientes (Aneurisma + AVEH) poderia ser mais representativo em número de homens para análise com o grupo de indivíduos saudáveis. Isso se dá devido a dificuldade de se encontrar indivíduos completamente saudáveis com idade mais avançada para comparativo com indivíduos com as patologias em estudo.

Foi observada diferença estatística quando os grupos aneurisma/AVEH/indivíduos saudáveis foram comparados em relação a HAS; indivíduos saudáveis apresentam menor acometimento de HAS quando comparados aos indivíduos acometidos por Aneurisma e por AVEH. Consequentemente, também foi observada essa mesma diferença quando o grupo de indivíduos saudáveis foi comparado com o grupo de pacientes total (Aneurisma + AVEH). No Brasil, a HAS constitui o principal fator de risco modificável para doença cerebrovascular, cuja

estimativa de prevalência está em torno de 11% a 20% acima dos 20 anos e 35% acima dos 50 anos. Em torno de 85% dos pacientes com AVE são hipertensos (ROMÁN; GIBBS, 1991). O fato de o AVE estar relacionado à hipertensão deve-se a fatores patológicos, como formação de ateromas, embolia no coração e má formações dos vasos cerebrais (LI et al., 2005). A HAS associada à condição anormal dos vasos sanguíneos cerebrais favorece significativamente a ruptura dos mesmos, resultando o extravasamento de sangue para dentro ou para o entorno das estruturas do sistema nervoso central (CHAVES, 2000). Portanto, nossos resultados somados aos já observados na literatura salienta a relação de risco entre a HAS e o desenvolvimento dessas patologias.

Após a análise das características clínicas e complicações presentes em pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral e por AVEH foi possível enquadrar os indivíduos em diferentes escalas de comprometimento neurológico (Tabela 2). Pode-se perceber que dentro da Escala de Glasgow todos os pacientes que sofreram aneurisma ($n = 33$) apresentaram um escore de 15 pontos, sendo este relacionado a um nível de consciência normal. Nessa mesma escala, os pacientes pós-AVEH encontram-se em sua maioria ($n = 55$) com a mesma pontuação de 15 pontos. Porém, há indivíduos que obtiveram escore de 9 pontos ($n = 4$) e 8 pontos ($n = 3$), relacionados a maiores níveis de acometimento neurológico. Pacientes com escores menores que 8 são considerados em coma, representando um estado de extrema urgência OLIVEIRA; PEREIRA; FREITAS, 2014).

Na Escala de Rankin, a maioria dos indivíduos acometidos por aneurisma ($n = 25$) se enquadraram no grau 1. Já os pacientes pós-AVEH foram classificados dentro do grau 0 ($n = 15$) e do grau 1 ($n = 18$) nessa mesma escala. Como este instrumento é de caráter gradativo, ou seja, quanto maior o valor atribuído ao paciente dentro desta, maior é o comprometimento neurológico do mesmo, grande parte dos indivíduos dentro dessa avaliação está sem sintomas ou com nenhuma incapacidade significativa. Observa-se que quatro pacientes pós-AVEH foram classificados no grau 5 dessa escala, expressando um quadro neurológico grave. Isso demonstra que, de acordo com a escala de Rankin, o AVEH leva a um quadro de comprometimento neurológico mais grave.

A distribuição de pacientes na escala NIHSS é variável dentro das pontuações que se adequam ao comprometimento neurológico dos indivíduos analisados. Pacientes vítimas de aneurisma encontram-se com pontuações baixas, de valor 0 (n = 14), 1 (n = 3), 2 (n = 5), 3 (n = 3), 4 (n = 3) e 6 (n = 5), demonstrando, em sua maioria, um comprometimento neurológico leve (pontuação de 0 a 5). Por outro lado, o grupo de pacientes que sofreram um AVEH exibiu um arranjo mais preocupante, observado pelo enquadramento destes nos níveis da escala que caracteriza um comprometimento neurológico moderado a grave. Esses resultados demonstram mais uma vez que, o AVEH leva a um maior comprometimento neurológico quando comparado ao aneurisma intracerebral.

A análise realizada por meio do índice de Barthel evidencia que o grupo de pacientes pós-aneurisma não indicam dependência na execução de atividades diárias relacionadas à independência funcional e a mobilidade do indivíduo, já que esses apresentam pontuações iguais ou superiores a 80. Porém, mesmo com a maioria dos pacientes vítimas de AVEH apresentando pontuações acima de 50 (n = 55), há um relevante número de indivíduos (n = 15) que se caracterizam como dependentes funcionais e de mobilidade. Isso nos mostra, novamente, que o comprometimento neurológico é maior nos indivíduos que apresentam AVEH, quando comparados aos que apresentam aneurisma intracerebral.

A avaliação referente à frequência alélica e genotípica do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I em relação as escalas avaliativas do grau de comprometimento dos pacientes acometidos com Aneurisma Intracerebral e AVEH (Escala de Glasgow, Escala de Rankin, NIHSS e Índice Barthel) mostrou significância em duas das escalas utilizadas: a Escala de Rankin e a NIHSS.

Na Escala de Rankin, a frequência alélica do VEGF -2549 18pbD foi maior quando comparada com a frequência do VEGF -2549 18pbl em pacientes doentes. Tal escala mensura de modo crescente o grau de incapacidade e dependência dos doentes. Foi possível observar que do grau 1 para o grau 3 há um aumento da frequência do alelo VEGF -2549 18pbD, presumindo-se que tal alelo é um fator de risco para com o agravamento da sequela do paciente.

Já na escala NIHSS, a frequência alélica do VEGF -2549 18pbD também foi maior quando comparada com a frequência do VEGF -2549 18pbl em pacientes doentes, porém, só nas pontuações 0, 1 e 4. No entanto, a frequência do alelo VEGF -

2549 18pbI foi maior do que alelo VEGF -2549 18pbD nas pontuações 3 e 6. A frequência genotípica VEGF -2549 18pbII também foi maior na pontuação 3 quando relacionada com a pontuação 1. Esta mesma avaliação alélica e genotípica quando aplicada em pacientes pós-AVEH apresentou significância apenas na escala NIHSS. A frequência do alelo VEGF -2549 18pbD foi mais elevada do que a do alelo VEGF -2549 18pbI nas pontuações de valor 0, entretanto, na pontuação de valor 2, o contrário é observado: a frequência do alelo VEGF -2549 18pbI é maior que a frequência alélica do VEGF -2549 18pbD. Nota-se também que há um decréscimo na frequência do alelo foi VEGF -2549 18pbD da pontuação 0 para a pontuação 4, e uma maior frequência do alelo VEGF -2549 18pbI da pontuação 0 para a pontuação 4. A frequência genotípica VEGF -2549 18pbDD foi menor na pontuação 2 quando comparada à pontuação 0. Como a escala NIHSS é estratificada com o intuito de constatar a gravidade da doença, sendo que até 3 pontos, o comprometimento neurológico é leve; já de 4 a 15 pontos, há um comprometimento moderado, não foi possível fazer uma associação lógica entre as frequências alélicas e genotípicas com o grau de acometimento neurológico e funcional desses pacientes. Porém, mais estudos são necessários para atestar esses polimorfismos como fatores de risco e se as demais correlações são fidedignas. Como a escala NIHSS é estratificada com o intuito de constatar a gravidade da doença, sendo que até 3 pontos, o comprometimento neurológico é leve; já de 4 a 15 pontos, há um comprometimento moderado, não foi possível fazer uma associação significativa entre as frequências alélicas e genotípicas com o grau de acometimento neurológico e funcional desses pacientes. Apesar de serem encontradas comparações estatisticamente relevantes dos alelos e genótipos com diferentes níveis das diferentes escalas, a distribuição das frequências não foi crescente ou decrescente quanto aos graus de comprometimento, não sendo possível constatar uma relação dessas frequências com um dado prognóstico para o comprometimento neurológico pós patologias vasculares. Isso revela que mais estudos são necessários para atestar esses polimorfismos como fatores de risco e se as demais correlações são fidedignas.

Neste trabalho, foram observadas maiores frequências do alelo VEGF -2549 18pbD em pacientes com AVEH e no grupo de pacientes total (Aneurisma + AVEH) e do genótipo VEGF -2549 18pbDD nos pacientes acometidos com aneurisma intracerebral como também no grupo de pacientes total (Aneurisma + AVEH) quando comparados ao grupo de controles saudáveis. Estudos funcionais *in vitro* relataram que a presença do alelo VEGF -2549 18pbD na região promotora do gene conduz a um

aumento da expressão de VEGF (COOPER et al. , 1999). Outros resultados também mostram que a presença do alelo VEGF -2549 18pbD leva a um aumento de aproximadamente 2 vezes na atividade de transcrição do gene em comparação com o alelo VEGF -2549 18pbl (YANG et al. 2003). Em relação a sua ação nos vasos, estudos mostram que o VEGF exerce influência na homeostase vascular, possuindo um papel crítico na angiogênese, na permeabilidade vascular e na capacidade de induzir fenestrações em células endoteliais (ROBERTS WG; PALADE, 1995). Visto a importância do VEGF na formação e manutenção dos vasos, esperava-se que a presença do alelo/genótipo responsável por maior produção de VEGF estivesse presente em maior frequência em indivíduos saudáveis. Intrigantemente, nosso estudo demonstrou que o alelo VEGF -2549 18pbD e o genótipo VEGF -2549 18pbDD (maiores produtores) possui maior frequência nos pacientes doentes acometidos por AVEH e aneurisma intracerebral, respectivamente, sendo estes, possíveis marcadores para uma pré-disposição ao desenvolvimento dessas patologias.

Deve-se levar em consideração o fato de que, no caso de AVE, a etiologia complexa da doença sugere que polimorfismos genéticos individuais têm efeitos modestos que são difíceis de detectar (DICHGANS; MARKUS, 2005). Assim, estudos de níveis de expressão de VEGF nos indivíduos acometidos por aneurisma intracerebral e AVEH contendo os diferentes alelos/genótipos da posição -2549 (18pb D/I) são necessários para uma melhor elucidação do papel do desses polimorfismos na fisiopatologia dessas doenças. Até o momento, não há nenhum trabalho na literatura que tenha analisado a possível associação do polimorfismo da região promotora do gene do fator de crescimento vascular endotelial – VEGF (-2549 (18pb D/I) em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e Aneurisma Intracerebral. Isso faz de nosso estudo pioneiro e base para estudos adicionais de outros grupos que possam vir a ser realizados.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo sugere que há relação do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I com o desenvolvimento de aneurisma intracerebral ou AVEH. Foram identificadas maiores frequências do alelo VEGF -2549 18pbD em pacientes com AVEH e do genótipo VEGF -2549 18pbDD nos pacientes acometidos com aneurisma intracerebral quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis, supondo que essa característica seja um fator de risco para o desenvolvimento de tais doenças. Porém, não foram constatadas evidências de que as frequências alélicas e genotípicas influenciam nas escalas avaliadoras do nível de comprometimento neurológico e funcional do paciente pós- Aneurisma Intracerebral e pós-AVEH por conta das distribuições aleatórias de tais frequências nos níveis das escalas.

8. REFERÊNCIAS

ALLANORE, Y.; BORDERIE, D.; AIRO, P.; GUIDUCCI, S.; CZIRJÁK, L.; NASONOV, E.L.; RIEMEKAŠTEN, G.; CARAMASCHI, P.; MAJDAN, M.; KRASOWA, D.; FRIEDL, E.; LEMARECHAL, H.; ANANIEVA, L. P.; NIEVSKAYA, T.; EKINDJIAN, O. G.; MATUCCI-CERINIC, M.; KAHAN, A. Lack of association between three vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and systemic sclerosis: results from a multicenter EUSTAR study of European Caucasian patients. **Ann Rheum Dis.** v. 66, p. 257–259, 2007.

AWATA, T.; INOUE, K.; KURIHARA, S.; OHKUBO, T.; WATANABE, M.; INUKAI, K. INOUE, I.; KATAYAMA, S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 51, p. 1635–1639, 2002.

BLACK, J. M.; MATASSARIN-JACOBS, E.; LUCKMANN; FORENSEN. **Enfermagem médico-cirúrgica: uma abordagem psicofisiológica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 6, p. 589-796, 1996.

BLEDA, S.; DE HARO, J.; VARELA, C.; ESPARZA, L.; FERRUELO, A.; ACIN, F. Vascular endothelial growth factor polymorphisms are involved in the late vascular complications in Type II diabetic patients. **Diab Vasc Dis Res.** v. 9, p. 68–74, 2012.

BONNEVILLE, F.; SOUROUR, N.; BIONDI, A. Intracranial aneurysms: an overview. **Neuroimaging Clin N Am.** v. 16, n.3, p. 371-382, 2006.

BOTTOMLEY, M. J.; BRENCHELEY, P. E. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine.** v. 12, p. 1232–1235, 2000.

BRITO, R. G.; LINS, L. C. R. F.; ALMEIDA, C. D. A.; NETO, S. R. N., ARAÚJO, D. P.; FRANCO, C. I. F. F. Instrumentos de Avaliação Funcional Específicos Para o Acidente Vascular Cerebral. **Revista Neurociências,** v. 21, n. 4, p. 593-599, 2013.

BROTT, T.; ADAMS, H. JR.; OLINGER, C.; MARLER, J.; BARSAN, W.; BILLER, J.; SPILKER, J.; HOLLERAN, R.; EBERLE, R.; HERTZBERG, V.; Measurements of acute cerebral infarction: A clinical examination scale. **Stroke**. v. 20, p. 864-870, 1989.

BRUNO, A.; SWITZER, J. A. Prestroke modified Rankin Stroke Scale has moderate interobserver reliability and validity in an acute stroke setting. **Stroke**, v. 44, n. 5, p. 43, 2013.

BURACZYNSKA, M.; KSIAZEK, P.; BARANOWICZ-GASZCZYK, I.; et al. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. **Nephrol Dial Transplant**. v. 22, p. 827–832, 2007.

CAPP, C. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (vegf) e de seus receptores (VEEGF 1 e 2) em amostras de tecido tireoidiano de pacientes com carcinoma medular de tireóide. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia**; Porto Alegre, setembro de 2009.

CARDOZO, J.; MAIA, L. C.; PARACAMPOS, B.; HOLANDA, M. F. C. Fatores de risco em pacientes com aneurismas intracranianos atendidos em um hospital de referência de Belém-PA / Risk factors in patients presenting with intracranial aneurysms assisted in a reference hospital in Belém-PA. **J. bras. neurocir**. v. 22, n. 3, p. 95-99, 2011.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Rev Bras Hipertens**. v. 4, p. 372-382, 2000.

CLARK, W. M.; HOURIHANE, J. M. **Clinical Stroke Scales**. Herndon RM, ed. Handbook of neurological rating scales. New York: Demos Vermande, p.161-186, 1997.

COSTA, A. P. C; GARCIA, H. C.; COPRESKI, B.; BRUNONI, D.; Estudo de polimorfismos de dna associados aos distúrbios do desenvolvimento. **Cadernos de pós-graduação em distúrbios do Desenvolvimento**. São Paulo, v.7, n.1, p.112-131, 2007.

DICHGANS, M.; MARKUS, H. S. Associação genética estudos em curso: questões metodológicas e critérios da norma de propostas. **Stroke**. 2005; v. 36, p. 2027-2031.

DVORAK, H. F.; HARVEY, V. S.; ESTRELLA, P.; BROWN, L. F.; MCDONAGH, J.; DVORAK, A. M. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. **Lab Invest**, v. 57, p. 673-686, 1987.

FÁTIMA, L. A.; PAPA, C. P. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da biologia**, v. 4, 2010.

FALCÃO, I. V.; ET AL. Acidente vascular cerebral precoce: implicações para adultos em idade produtiva atendidos pelo Sistema único de Saúde. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.4, n.1, 2004.

FEERO, W. G.; GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, F. S. Genomic medicine—an updated primer. **N Engl J Med**, v. 362, n. 21, p. 2001-2011, 2010.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O'SHEA, K. S.; POWELL-BRAXTON, L.; HILLAN, K. J.; MOORE, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v. 380, p. 439–442, 1996.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. N. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442–447, 1991.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat med**. n. 9, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrine Reviews**. v. 18, n. 1. P. 4-25, 1997.

FREITAS, G. B. L.; HOELZ, L. V. B.; AGUIAR, D. L. M.; ALENCASTRO, R. B.; SAN GIL, R. A. S. Sistema VEGF, um alvo multi-terapêutico. **Rev. Virtual Quim.** v. 1, n. 3, p. 257-269, 2009.

GOLDSTEIN, D B., CAVALLERI G. L. Understanding human diversity. **Nature**, v. 437, p.1241-1242, 2005.

GEORGE GP, MITTAL RD. Association of polymorphic variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in relation to risk and androgen therapy response in prostate cancer patients of North India. 2011.

GREENBERG, D. A.; JIN, K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. **Cell Mol Life Sci.** v. 70, n. 10, p. 1753-1761, 2013.

GUERESI, J. R.; IUNG, T. C.; BRANCO, L. T. O.; MEDEIROS, S. M.; SAKAE, T. M.; Sequelas em pacientes com hemorragia subaracnóide por ruptura de aneurisma intracraniano. **Arquivos Catarinenses de Medicina.** v. 40, n. 2, p. 34 – 40, 2011.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science.** v. 277, p. 48- 50, 1997.

HELLEN, C. U.; SARNOW, P. Internal Ribosome Entry Sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes & Development**, v. 15, p. 1593-1612, 2001.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol.** v. 23, p. 1011-1027, 2005.

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T.; BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol. Rev.** v. 56, p. 549, 2004.

HOLANDA, L. et al. Hemorragia meníngea. **Manual de neurocirurgia**, 2 ed. São Paulo: Fundo BYK, cap. 7, p. 87-95, 1995.

HOLMES, D. I. R.; ZACHARY, I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. **Genome Biol.** v. 6, n. 209, p. 1-10, 2005.

HUMPHREY, J. D.; TAYLOR, C. A. Intracranial and abdominal aortic aneurysms: similarities, differences, and need for a new class of computational models. **Annu Rev Biomed Eng.** v. 10, p.221-46, 2008.

JAJA, B. N.; CUSIMANO, M. D.; ETMINAM, N.; HANGGI, D.; HASAN, D.; ILODIGWE, D.; LANTIGUA, H.; LE ROUX, P.; LO, B.; LOUFFAT-OLIVARES, A.; MAYER, S.; MOLYNEUX, A.; QUINN, A.; SCHWEIZER, T. A.; SCHENK, T.; SPEARS, J.; TODD, M.; TORNER, J.; VERGOUWEN, M. D.; WONG, G. K.; SINGH, J.; MACDONALD, R. L. Clinical prediction models for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. **Neurocrit Care.** v. 18, n. 1, p. 143-153, 2013.

JIN, Q.; HEMMINKI, K.; ENQUIST, K.; LENNER, P.; GRZYBOWSKA, E.; KLAES, R.; HENRIKSSON, R.; CHEN, B.; PAMULA, J.; PEKALA, W.; ZIENTEK, H.; ROGOZINSKA-SZCZEPKA, J.; UTRACKA-HUTKA, B.; HALLMANS, G.; FÖRSTI, A. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. **Clin Cancer Res.** v. 15, n. 10, p. 3647-3653, 2005.

JUELA S. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: risks for aneurysm formation, growth, and rupture. **Acta Neurochir.** v. 82, p. 27–30, 2002.

KAPAH, R.; MANJARI, M.; SINGH-UPPAL, M. SINGH, N. R.; SAMBYAL, V.; GULERIA, K. Association of 2549 Insertion/Deletion Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor with Breast Cancer in North Indian. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers.** v. 17, n. 3, p. 242-248, 2013.

KRIPPL, P.; LANGSENLEHNER, U.; RENNER, W.; YAZDANI-BIUKI, B.; WOLF, G.; WASCHER, T. C.; PAULWEBER, B.; HAAS, J.; SAMONIGG, H. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. **Int J Cancer.** v. 106, p. 468–471, 2003.

LIN, C. C.; WU, H. C.; TSAI, F. J.; CHEN, H. Y.; CHEN, W. C. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. **Urology**. v. 62, p. 374–377, 2003.

MANASH KP, MUKHOPADHYAY AK. Tyrosine kinase: role and significance in cancer. **Int j med sci**. v. 1, p. 101-115, 2004.

MATARIN, M.; BROWN, W. M.; DENA, H.; BRITTON, A.; DE VRIEZE, F. W. ; BROTT, T. G.; BROWN, R. D.; WORRALL, B. B.; CASE, L. D.; CHANOCK, S. J.; METTER, E. J.; FERRUCE, L.; GAMBLE, D.; HARDY, J. A.; RICH, S. S.; SINGLETON, A.; MESCHIA, J. F. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. **Stroke**. v. 40, p. 3436-3442, 2009.

MELO-SOUZA, SE. **Tratamento das Doenças Neurológicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.140-142, 2008

MINOSSO, J. S. M.; AMENDOLA, F.; ALVARENGA, M. R. M.; OLIVEIRA, M. A. C. Validação, no Brasil, do Índice de Barthel em idosos atendidos em ambulatórios. **Acta paul. enferm**. v. 23, n. 2, p. 218-223, 2010.

MIRANDA, M. Aneurisma cerebral. **iNeuro; blog neurologia inteligente**. Disponível em: <<http://www.ineuro.com.br/para-os-pacientes/aneurisma-cerebral/>>. Acesso em: set. 2015.

MOCCO, J.; KOMOTAR, R. J.; LAVINE, S.; MEYERS. P. M.; CONNOLLY, S.; SOLOMON, R. The natural history of unruptured intracranial aneurysms. **Department of Neurological Surgery, Columbia University**, New York, 2004.

NETTER, Frank H. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

OLIVEIRA, D. M. P.; PEREIRA, C. U.; FREITAS, Z. M. P. Escalas para avaliação do nível de consciência em trauma cranioencefálico e sua relevância para a prática de enfermagem em neurocirurgia. **Arq Bras Neurocir**. v. 33, n. 1, p. 22-32, 2014.

PARK, J. E.; CHEN, H. H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **The Journal of Biological chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, 2004.

PULSINELLI, W. A. **Doenças vasculares cerebrais-princípios**. Goldman L, Bennett JC. Cecil: tratado de medicina interna. 21nd., ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 2352-2359, 2001.

REDE BRASIL AVC. Uma ameaça silenciosa. **Zero Hora**, 7 de agosto de 2010. Disponível em: <<http://www.redebrasilavc.org.br/para-pacientes-e-falimiores/o-que-e-aneurisma-cerebral/>>. Acesso em: set 2015.

ROBERTS, W. G.; PALADE, G. Maior permeabilidade microvascular e fenestration endotelial induzida pelo fator de crescimento vascular endotelial. **J Cell Sci**. v. 108, p. 2369-2379, 1995.

ROHR, J.; KITTNER, S.; FEESER, B.; HEBEL, J. R.; WHYTE, M. G.; WEINSTEIN, A.; KANARAK, N.; BUCHHOLZ, D.; EARLEY, C.; JOHNSON, C.; MACKO, R.; PRICE, T.; SLOAN, M.; STERN, B.; WITYK, R.; WOZNIAK, M.; SHERWIN, R. Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults: the Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. **Arch Neurol**. v. 53, p. 603–607, 1996.

ROMÁN, G. C.; GIBBS, C. J. Neuroepidemiology of stroke in Brazil. Neuroepidemiology: an international perspective. **New Issues in Neurosciences**. v. 3, p. 448-51, 1991.

ROWLAND, L. P. M. **Tratado de Neurologia**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ROY H, BHARDWAJ S, YLA-HERTTUALA S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett**. v. 580, p. 2879-2887, 2006.

SCHAFER, A; HAWKINS J.R. DNA variation and the future of human genetics. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 33-39, 1998.

SEQUEIRA, C. **Cuidar de idosos dependentes**. Coimbra: Quarteto Editora. 2007.

SAYAMA, C. M.; MACDONALD, J. D. Aneurysmal bone cyst of the petrous bone: case presentation and review of the literature. **Pediatr Neurosurg**. v. 46, n. 4, p. 308-312, 2010.

SCHAEFER, S. Review: In older patients without CVD, statins reduce MI and stroke but not all-cause mortality. **Ann Intern Med**. v. 160, n. 10, p. JC8, 2014.

SIM, R. Doença Cerebrovascular Isquêmica Aguda: Avaliação de Protocolo de Trombólise (Dissertação). Covilhã: Universidade da Beira Interior. 2008.

STOUFFER, R. L., MARTINEZ-CHEQUER, J. C., MOLSKNESS, T. A. XU, F.,HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 567-575, 2001.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO MEDICINE. Aneurisma Cerebral. Disponível em: <<http://www.uchospitals.edu/online-library/content=S08278>>. Acesso em: set 2015.

TURCATO, C.; PEREIRA, S. W.; GHIZONI, M. F.; Hemorragia subaracnóide **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 35, n. 2, p.78-84, 2006.

VINCENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, M.; PERSICO, G. Assignment of the vascular endotheli-al growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation**. v. 93, p. 1493–1495, 1996.

WANG, X.; CHENG, S.; BROPHY, V. H.; ERLICH, H. A.; MANNHALTER, C.; BERGER, K.; LALOUSCHEK, W.; BROWNER, W. S.; SHI, Y.; RINGELSTEIN, E. B.; KESSLER, C.F.; LUEDMANN, J.; LINDPAINTER, K.; LIU, L.; RIDKER, P. M.; ZEE, R. Y. L.; COOK, N. R. Patients Study Populations: Association of Lymphotoxin-Alpha in Nonhypertensive

A Meta-Analysis of Candidate Gene Polymorphisms and Ischemic Stroke in 6. **Stroke**. v. 40, p. 683-695, 2009.

WATSON, C. J.; WEBB, N. J. A.; BOTTOMLEY, M. J.; BRECHLEY, P. E. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine**. v. 12, p. 1232–1235, 2000.

YAMADA, Y.; METOKI, N.; YOSHIDA, H.; SATOH, K. S.; KATO, K.; HIBINO, T.; YOKOI, K. Y.; WATANABE, S.; ICHIHARA, S.; AOYAGI, Y.; YASUNAGA, A.; PARK, H.; TANAKA, M.; NOZAWA, Y. Genetic Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke in Japanese Individuals. **Stroke**. v. 39, p. 2211-2218, 2008.

YANG, B.; CROSS, D. F.; OLLERENSHAW, M.; MILLWARD, B. A.; DEMAINE, A. G. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**. v. 17, p. 1-6, 2003.

ZHANG, L. F.; YANG, J.; HONG, Z.; YUAN, G. G.; ZHOU, B. F.; ZHAO, L. C.; HUANG, Y. N.; CHEN, J.; WU, Y. F.; Collaborative Group of China Multicenter Study of Cardiovascular Epidemiology. Proportion of different subtypes of stroke in China. **Stroke**. v. 34, p. 2091-2096, 2003

ANEXO 1 - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa/SES-DF.



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0095/2010

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 380/2010 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E AO ANEURISMA INTRACEREBRAL.

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 15/12/2012

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO.**

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 16 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

AL/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-907

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO 2 – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

Ficha de identificação dos participantes da pesquisa: Polimorfismo genético ctla4 -318 (c/t) associado ao acidente vascular encefálico hemorrágico e ao aneurisma intracerebral.

Nome do participante: _____

Nome do representante legal (se houver): _____

Idade: _____

Sexo: ☐ Masc. ☐ Fem.

Cor: _____

Estado Civil: _____

Data do acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou do aneurisma intracerebral: _____

Hipertensão arterial: ☐ Sim ☐ Não

Pressão Arterial: _____

Diabetes: ☐ Sim ☐ Não

Glicemia: _____

Tabagismo: ☐ Sim ☐ Não Se sim, quantos maços por dia: _____

Etilismo: ☐ Sim ☐ Não Se sim, quanto por dia: _____

Uréia: _____

Creatinina: _____

Plaquetas: _____

Escala de Glasgow: _____

Escala de Rankin: _____

Escala NIHSS: _____

Índice de Barthel: _____

ICH: _____

Tomografia: _____

Angiografia: _____

Observações: _____

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de todos participantes da pesquisa.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - Indivíduos “saudáveis”

Você está sendo convidado a participar do estudo “Polimorfismos genéticos associados ao acidente vascular encefálico e ao aneurisma intracerebral”. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

O objetivo do presente estudo é o de verificar a frequência de determinadas variantes do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em uma população de indivíduos que não apresentam aneurisma cerebral diagnosticado ou acidente vascular encefálico.

Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder uma ficha de identificação e autorizar uma única vez, a coleta de aproximadamente 10 ml (uma seringa) de sangue, através de uma punção de veia periférica no antebraço.

O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos e benefícios:

Este estudo possui desconfortos inerentes à coleta de sangue, como dor no local e formação de um hematoma (mancha roxa).

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local. Caso haja algum problema você receberá a atenção necessária e o ressarcimento de alguma eventual despesa.

Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre qual a frequência na população saudável de determinadas características genéticas que podem causar doenças e deste modo na melhor compreensão do fator genético de determinadas doenças.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade:

Seus dados serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados de seus exames serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos. Os resultados dos seus exames poderão ser entregues pela pesquisadora responsável mediante a sua solicitação, a qualquer momento, desde que as amostras já tenham sido processadas e analisadas. Esta solicitação poderá ser feita agora durante a assinatura deste TCLE, por email ou telefone, presentes neste TCLE, e a pesquisadora agendará uma reunião para a entrega do resultado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Assinatura do participante

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir participar ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder um questionário e autorizar que seu os pesquisadores possam ver seu prontuário, para que tenham maior conhecimento de seus exames, tratamento e da história da sua doença.

Após isso será coletado de você, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Benefícios:

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

Sua participação poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

Sua participação é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não participar, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o seu relacionamento com seu médico.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade:

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Seus dados serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados de seus exames, bem como as informações de seu prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma- AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Brasília, _____ de _____ de _____

Participante

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Representante Legal

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que o paciente sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja aceitar que o paciente sob sua responsabilidade (de livre e espontânea vontade) participe, você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida aprovar a participação, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

O paciente sob a sua responsabilidade está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir que ele participe ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

Procedimentos do estudo :

A participação do paciente sob sua responsabilidade consiste em autorizar que seu os pesquisadores possam ver o prontuário do paciente, para que tenham maior conhecimento dos exames, tratamento e da história da sua doença do paciente que está sob sua responsabilidade.

Após isso será coletado do paciente sob sua responsabilidade, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Benefícios:

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo :

A participação do paciente sob sua responsabilidade é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá retirar a autorização de participação do paciente sob sua responsabilidade desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não concordar com a participação, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o relacionamento do paciente sob sua responsabilidade com a equipe médica.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não haverá nenhum tipo de compensação financeira pela participação neste estudo.

Confidencialidade:

Os registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Os dados do paciente sob sua responsabilidade serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados dos exames, bem como as informações do prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: [61\) 3325-4955](tel:61-3325-4955). Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em permitir a participação do paciente sob minha responsabilidade, o Sr(a) _____ Brasília, _____ de _____ de _____

Responsável pelo Participante da pesquisa

ANEXO 4 – Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.

Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda de seu material biológico (sangue). Você poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. A decisão é sua.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari e será utilizado somente para verificar os polimorfismos genéticos do presente estudo.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número, mantendo-se assim o sigilo e respeito à confidencialidade dos seus dados.

Se for de seu interesse, você terá acesso aos resultados dos seus exames.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar a frequência de determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em indivíduos saudáveis.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

A qualquer momento você terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar seu material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda de meu material biológico (sangue) decorrente da presente pesquisa.

Assinatura do participante

Brasília, ____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda de seu material biológico (sangue). Você poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. A decisão é sua.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. - O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número. Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

A qualquer momento você terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar seu material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda de meu material biológico (sangue) decorrente da presente pesquisa.

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob sua responsabilidade. Você poderá autorizar ou não a guarda do material biológico do paciente sob sua responsabilidade.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

A qualquer momento você terá acesso aos dados do paciente sob sua responsabilidade e de seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar o material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca o nome do paciente ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com o nome do paciente sob sua responsabilidade. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob minha responsabilidade.

Paciente sob minha responsabilidade:

Assinatura do participante
Brasília, ____ de _____ de _____

ANEXO 5 – Escala de coma de Glasgow

	Variáveis	Escore
Abertura ocular	Espontânea	4
	À voz (comando verbal)	3
	À dor	2
	Ausente	1
	Não testável (NT) – Em pacientes com edema ou hematoma que impossibilita a abertura dos olhos	
Melhor resposta verbal	Orientado	5
	Confuso	4
	Palavras inapropriadas	3
	Palavras ou sons incompreensivos	2
	Sem resposta	1
	Não testável (NT) – Em pacientes intubados	
Resposta motora	Obedece a comandos	6
	Localiza dor	5
	Movimento de retirada à dor	4
	Flexão anormal	3
	Extensão anormal	2
	Nenhuma resposta	1

Fonte: Adaptado de Oliveira; Pereira; Freitas, 2014

ANEXO 6 – Índice de Barthel

Atividade	Pontuação
Alimentação 0 = incapacitado 5 = precisa de ajuda para cortar, passar manteiga, etc, ou dieta modificada 10 = independente	
Banho 0 = dependente 5 = independente (ou no chuveiro)	
Atividades rotineiras 0 = precisa de ajuda com a higiene pessoal 5 = independente rosto/cabelo/dentes/barbear	
Vestir-se 0 = dependente 5 = precisa de ajuda mas consegue fazer uma parte sozinho 10 = independente (incluindo botões, zipers, laços, etc.)	
Intestino 0 = incontinente 5 = acidente ocasional 10 = continente	
Sistema urinário 0 = incontinente, ou caracterizado e incapaz de manejo 5 = acidente ocasional 10 = continente	
Uso do toilet 0 = dependente 5 = precisa de alguma ajuda parcial 10 = independente (pentear-se, limpar-se)	
Transferência (da cama para a cadeira e vice versa) 0 = incapacitado 5 = muita ajuda (uma ou duas pessoas, física), pode sentar 10 = pouca ajuda (verbal ou física)	

15 = independente	
Mobilidade (em superfícies planas) 0 = imóvel ou < 50 metros 5 = cadeira de rodas independente, incluindo esquinas, > 50 metros 10 = caminha com ajuda de uma pessoa (verbal ou física), > 50 metros 15 = independente (mas pode precisar de alguma ajuda; como exemplo, bengala) > 50 metros	
Escadas 0 = incapacitado 5 = precisa de ajuda (verbal, física ou ser carregado) 10 = independente	

Fonte: Adaptado de <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2503/5/%C3%8Dndice%20de%20Barthel.pdf>

ANEXO 7 – Gráficos das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis e com relação a avaliações de déficit neurológico e dependência funcional (escalas de Rankin e NIHSS e índice de Barthel).

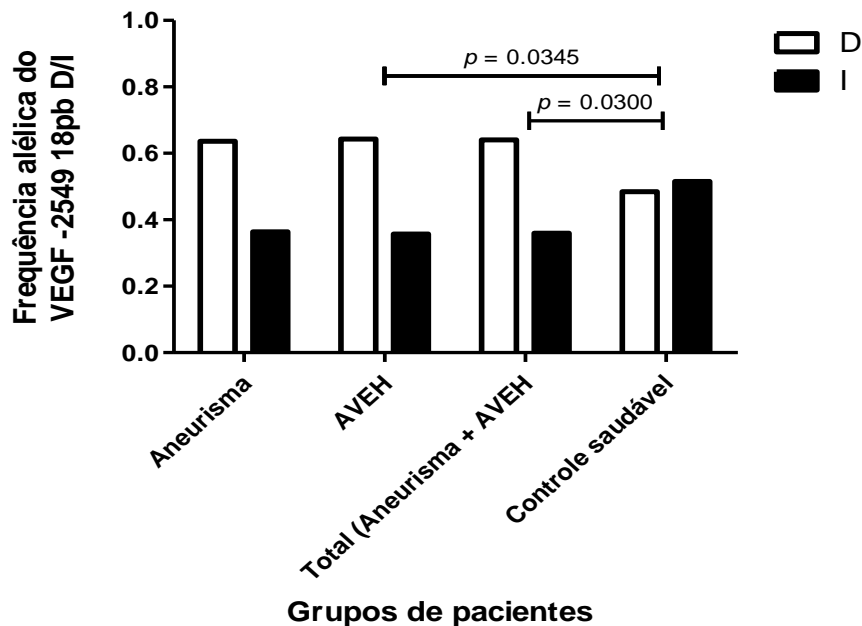


Gráfico 1: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0345$; *Odds ratio* = 2,591; Intervalo de confiança de 95% = 1,056 a 3,464.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0300$; *Odds ratio* = 1,895; Intervalo de confiança de 95% = 1,082 a 3,320.

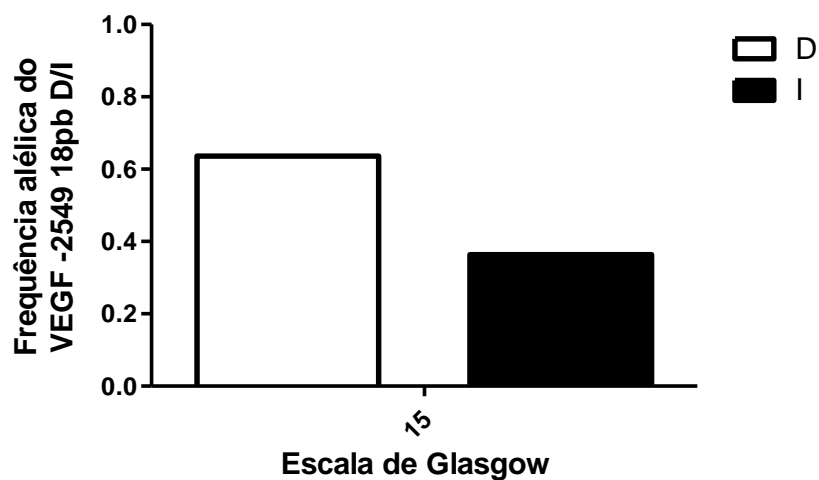
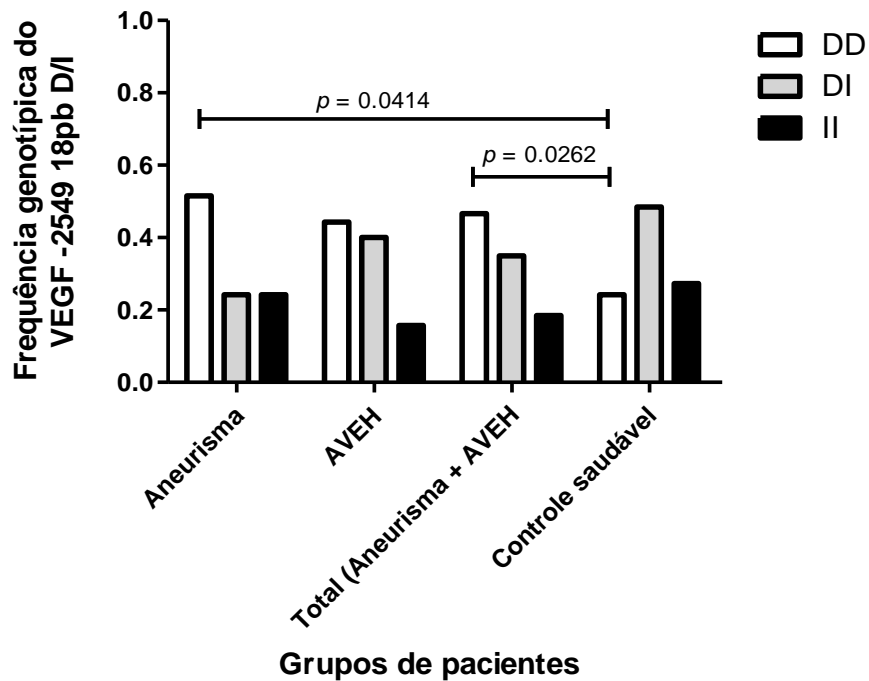


Gráfico 3: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Glasgow em pacientes acometidos com aneurisma.

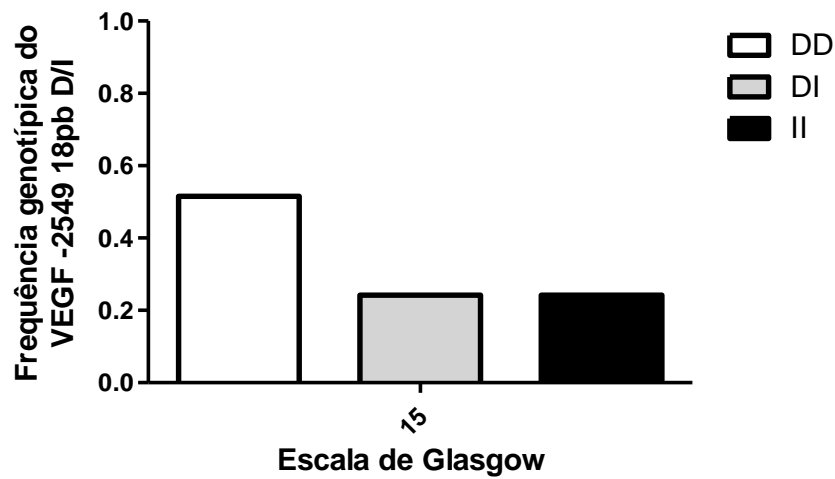


Gráfico 4: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Glasgow em pacientes acometidos com aneurisma.

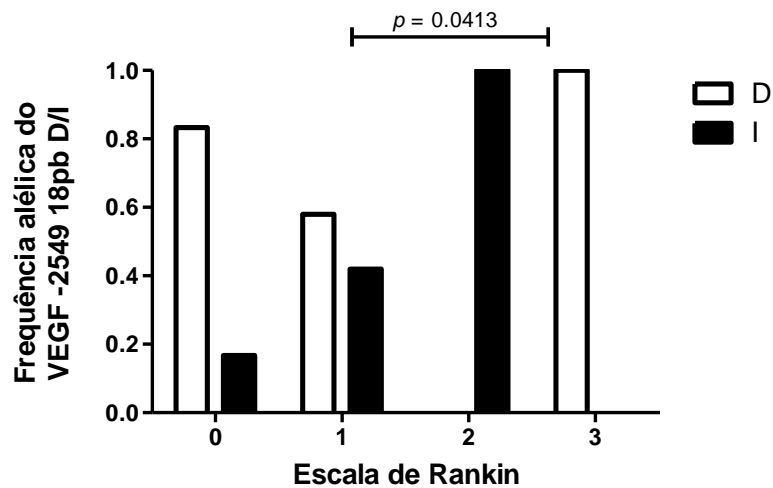


Gráfico 5: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Rankin em pacientes acometidos com aneurisma.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0413$; Odds ratio = 0,08071; Intervalo de confiança de 95% = 0,004412 a 1,476.

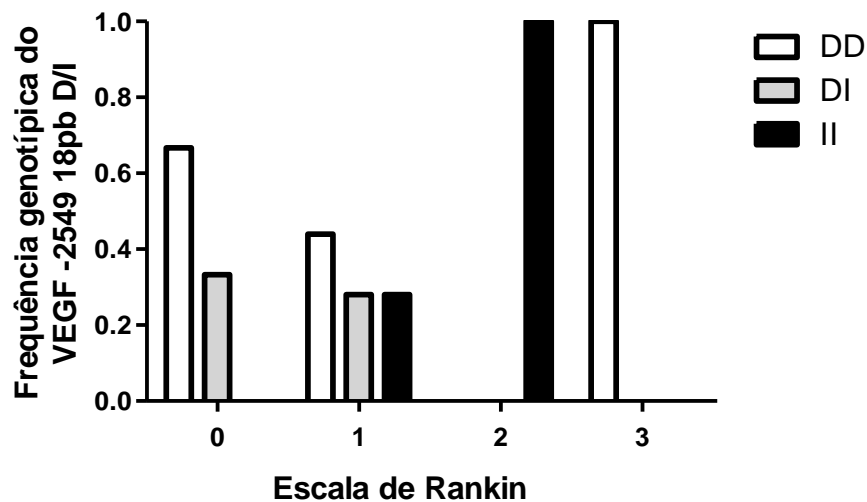


Gráfico 6: Frequências genótípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Rankin em pacientes acometidos com aneurisma.

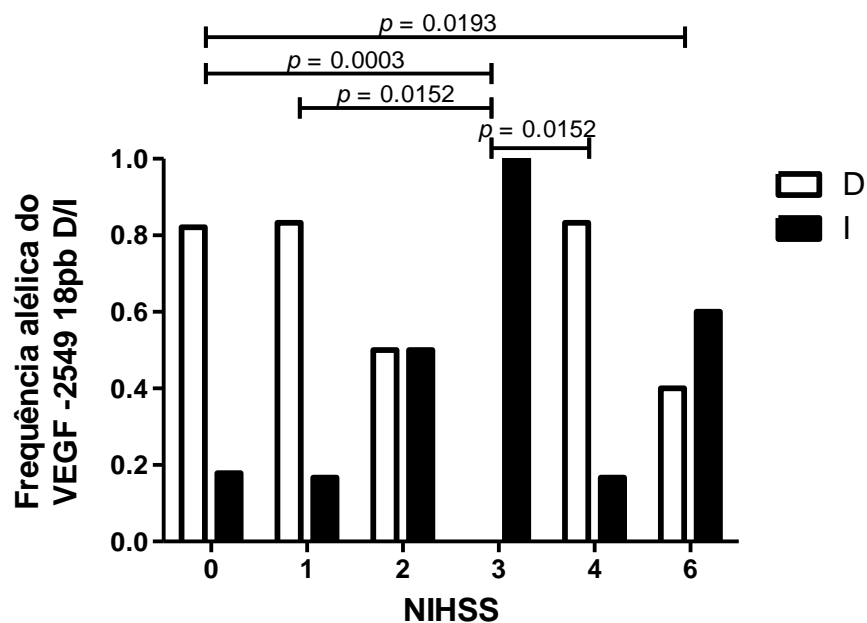


Gráfico 7: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da NIHSS em pacientes acometidos com aneurisma.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0193$; *Odds ratio* = 6,900; Intervalo de confiança de 95%= 1,403 a 33,93.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0003$; *Odds ratio* = 55,55; Intervalo de confiança de 95%= 2,702 a 1142.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0152$; *Odds ratio* = 47,67; Intervalo de confiança de 95%= 1,596 a 1424.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0152$; *Odds ratio* = 0,02098; Intervalo de confiança de 95%= 0,0007023 a 0,6267.

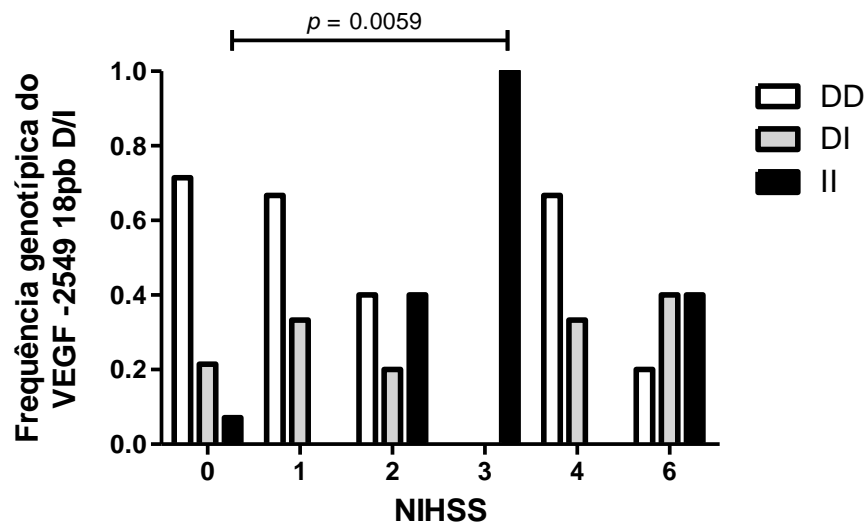


Gráfico 8: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da NIHSS em pacientes acometidos com aneurisma.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0059$; *Odds ratio* = 0,01587; Intervalo de confiança de 95% = 0,0005242 a 0,4807.

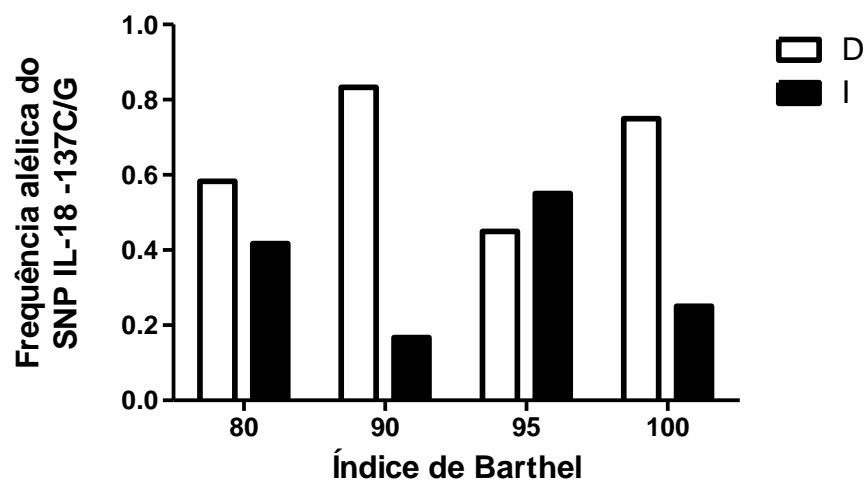


Gráfico 9: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis do Índice de Barthel em pacientes acometidos com aneurisma.

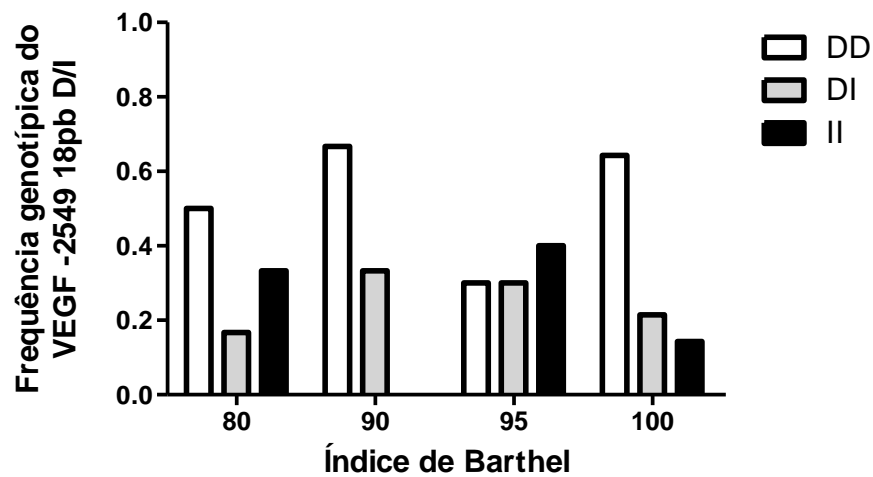


Gráfico 10: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis do Índice de Barthel em pacientes acometidos com aneurisma.

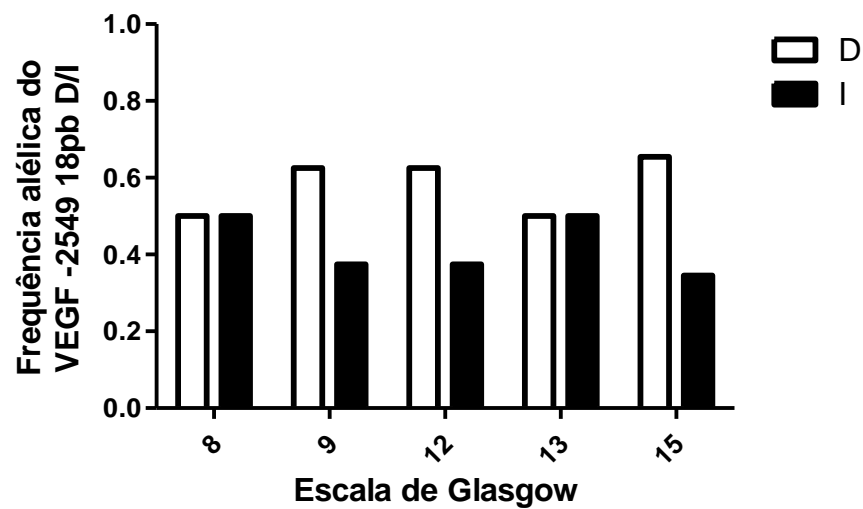


Gráfico 11: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Glasgow em pacientes acometidos com AVEH.

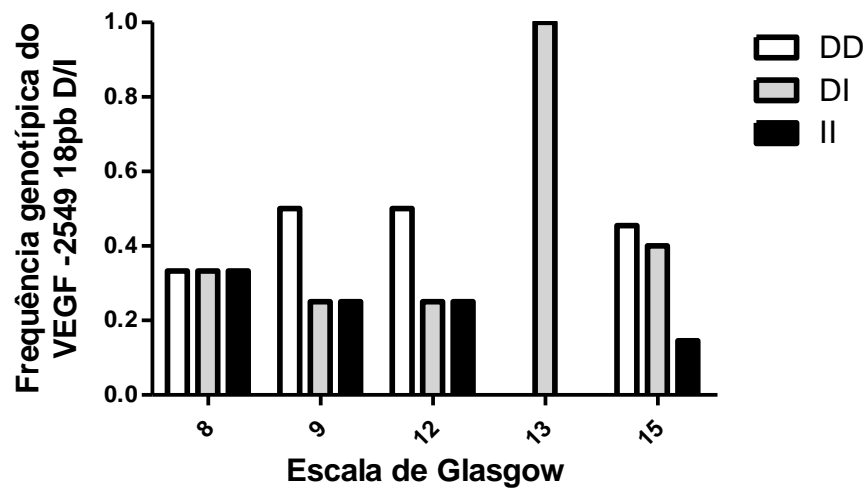


Gráfico 12: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Glasgow em pacientes acometidos com AVEH.

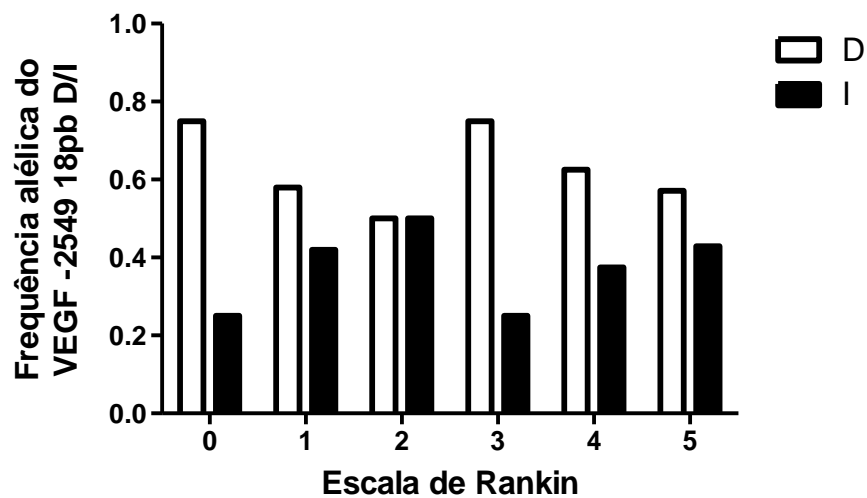


Gráfico 13: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Rankin em pacientes acometidos com AVEH.

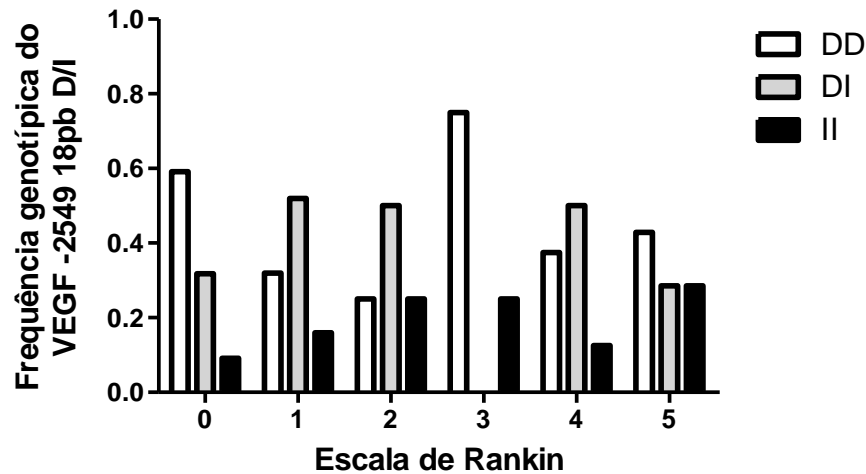


Gráfico 14: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da Escala de Rankin em pacientes acometidos com AVEH.

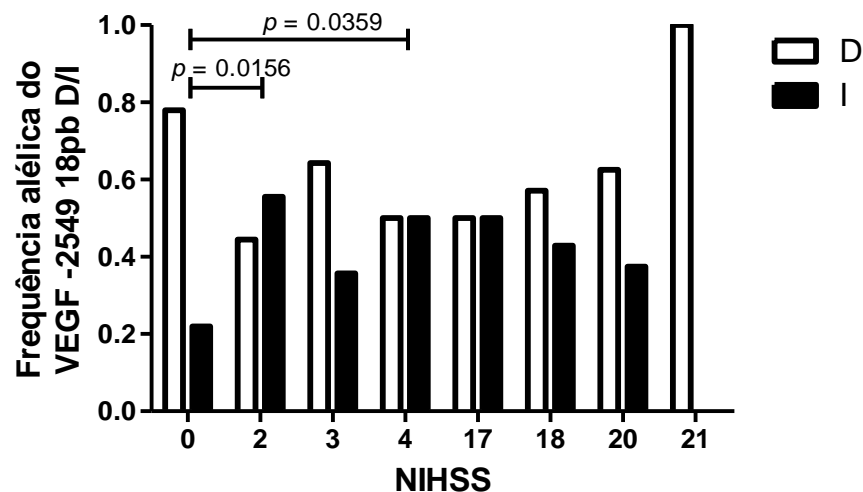


Gráfico 15: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da NIHSS em pacientes acometidos com AVEH.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0156$; *Odds ratio* = 4,432; Intervalo de confiança de 95% = 1,409 a 13,94.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0359$; *Odds ratio* = 3,545; Intervalo de confiança de 95% = 1,133 a 11,10.

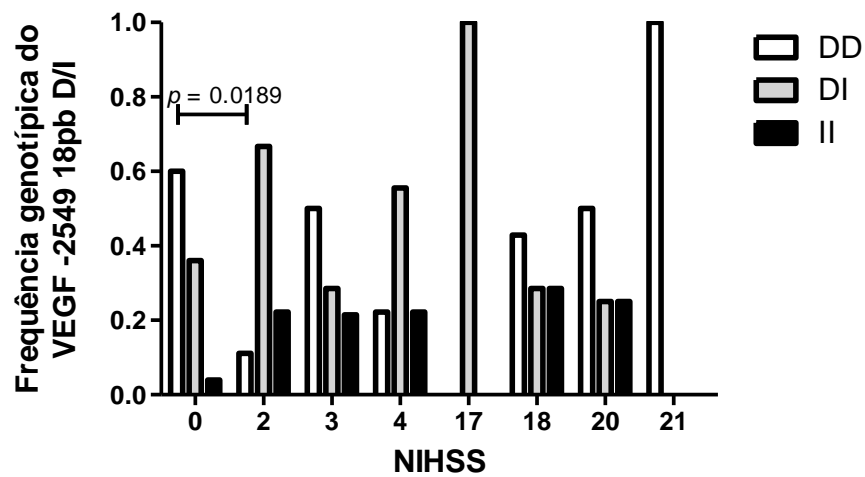


Gráfico 16: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis da NIHSS em pacientes acometidos com AVEH.

Teste exato de Fisher bicaudal (FET): $p = 0,0189$; *Odds ratio* = 12,00; Intervalo de confiança de 95% = 1,293 a 111,4.

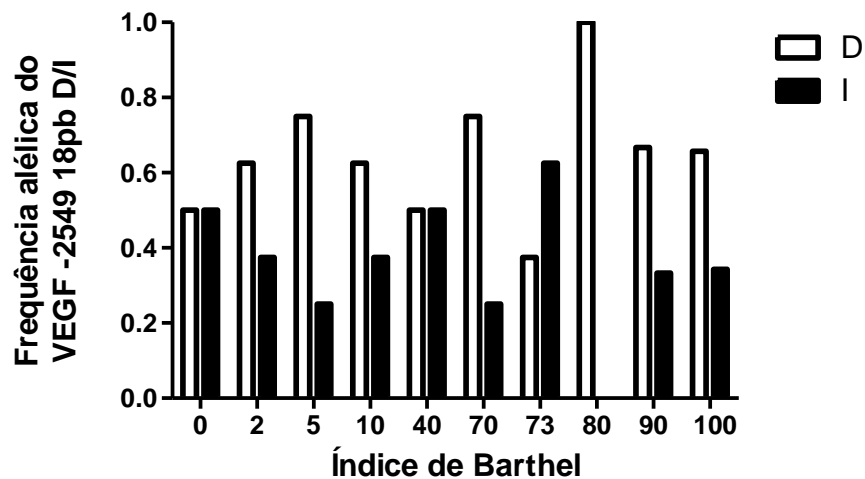


Gráfico 17: Frequências alélicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis do Índice de Barthel em pacientes acometidos com AVEH.

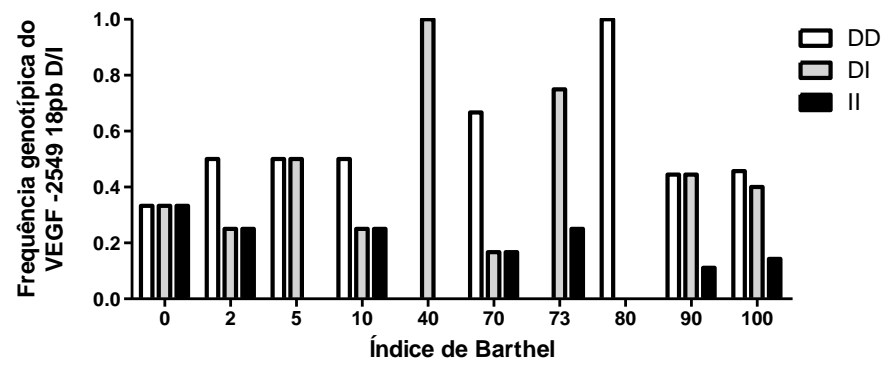


Gráfico 18: Frequências genotípicas do polimorfismo VEGF -2549 18pb D/I entre os diferentes níveis do Índice de Barthel em pacientes acometidos com AVEH.